

Stanovení vitamínů B v sýrech metodou HPLC

Vanda Malárová

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vanda MALÁROVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení vitamínů B v sýrech metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

- Teoreticky zpracovat kapitoly týkající se fyziologie vitamínů skupiny B.
- Zpracovat technologii mléka, zejména pak výrobu sýrů.
- Popsat princip HPLC.
- Rešeršně zpracovat možnosti stanovení vitamínů skupiny B a to pomocí kapalinové chromatografie (HPLC).

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] KADLEC, I., ŠULC, J. Suroviny a materiály mlékárenského průmyslu pro 1. ročník SOU, SNTL, Praha 1984.

[2] GAJDŮŠEK, S. Laktologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003.

[3] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. Technologie výroby živočišného původu, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006.

[4] COMBS, G.F. The vitamins, Academic Press, San Diego 1992.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

18. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem této práce je najít různé metody stanovení vitamínů B v sýrech metodou HPLC. Z důvodu komplexního přístupu k popisu výše zmiňované metody jsou v práci zahrnuty poznatky týkající se základních surovin pro výrobu sýrů, přes technologický postup výroby až po popis samotné metody. Práce je rozdělena do pěti základních částí. První část se věnuje chemickému složení, technologicky významným vlastnostem a jakostním požadavkům na mléko. V další dvou částech je popsán samotný postup výroby sýrů a fyziologie ve vodě rozpustných vitamínů skupiny B. Poslední dvě části popisují princip a konkrétní podmínky metody HPLC, kterými je možné stanovovat vitamíny B v sýrech.

Klíčová slova: sýr, HPLC, vitamín

ABSTRACT

The purpose of this study is to find several methods of determination of vitamin B in cheeses using HPLC method. For a of the description comprehensive approach of this method, there are explanatory notes and comments concerning raw material used for cheese production, technological production methods and description of HPLC method. The study is divided into five main sections. The first section describes chemical composition, technological properties and quality requirements concerning milk. In the second next sections there are descriptions of methods of cheese production and physiology of water soluble vitamins of B group. The final two sections describe principles and particular conditions of the HPLC method, which are suitable to determine the presence of vitamins B in cheeses.

Keywords: cheese, HPLC, vitamin

Děkuji své vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a informace při řešení bakalářské práce. Dále děkuji rodičům a svým blízkým za umožnění studia na vysoké škole a podporu, kterou mi poskytli při plnění studijních povinností.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	9
1 MLÉKO	11
1.1 BIOLOGICKÁ A VÝŽIVOVÁ HODNOTA MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ	11
1.2 SLOŽKY MLÉKA	12
1.2.1 Bílkoviny	12
1.2.2 Mléčný tuk.....	13
1.2.3 Mléčný cukr.....	13
1.2.4 Minerální látky	13
1.2.5 Vitamíny.....	14
1.2.6 Enzymy.....	15
1.3 TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÉ VLASTNOSTI MLÉKA.....	16
1.3.1 Kyselost.....	16
1.3.2 Kysací schopnost.....	16
1.3.3 Syřitelnost.....	16
1.3.4 Tepelná stabilita	17
1.4 MLÉKO JAKO SUROVINA K VÝROBĚ SÝRŮ.....	17
1.4.1 Požadavky kladené na jakost mléka z hlediska jeho chemického složení a fyzikálních vlastností	17
1.4.2 Požadavky kladené na jakost mléka z hlediska mikrobiologické čistoty.....	18
2 SÝRY	19
2.1 ROZDĚLENÍ SÝRŮ	20
2.2 TECHNOLOGIE VÝROBY SLADKÝCH SÝRŮ	23
2.2.1 Tepelné ošetření mléka.....	23
2.2.2 Úprava mléka před sýřením	24
2.2.3 Sýření mléka.....	24
2.2.4 Zpracování sýřeniny	24
2.2.5 Formování, odkapávání a lisování sýrů.....	24
2.2.6 Solení sýrů.....	24
2.2.7 Zrání sýrů	25
2.3 POPIS JEDNOTLIVÝCH DRUHŮ SLADKÝCH SÝRŮ	26
2.3.1 Čerstvé sýry	26
2.3.2 Měkké sýry	26
2.3.3 Polotvrdé a tvrdé sýry.....	27
2.3.4 Pařené sýry	27
2.4 TECHNOLOGIE VÝROBY KYSELÝCH SÝRŮ A TVAROHŮ	28
2.4.1 Technologie výroby tvrdého tvarohu	28
2.4.2 Technologie výroby měkkého tvarohu	28
2.4.3 Technologie výroby kyselých sýrů	28
2.5 TECHNOLOGIE VÝROBY TAVENÝCH SÝRŮ.....	29
3 FYZIOLOGIE VITAMÍNŮ SKUPINY B	30

3.1	VITAMÍN B ₁ – THIAMIN	31
3.2	VITAMÍN B ₂ – RIBOFLAVIN	32
3.3	VITAMÍN B ₃ – KYSELINA NIKOTINOVÁ A JEJÍ AMID.....	34
3.4	VITAMÍN B ₅ – KYSELINA PANTOTENOVÁ	35
3.5	VITAMÍN B ₆ – PYRIDOXIN	35
3.6	VITAMÍN B ₉ – KYSELINA LISTOVÁ.....	36
3.7	VITAMÍN B ₁₂ – KYANOKOBALAMIN	37
3.8	BIOTIN	39
4	KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	40
4.1	POPIS JEDNOTLIVÝCH ČÁSTÍ KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU	41
4.1.1	Zásobník s mobilní fází	41
4.1.2	Čerpadlo	42
4.1.3	Dávkovací ventil	42
4.1.4	Kolona	43
4.1.5	Detektory	44
4.1.5.1	Fotometrické detektory	44
4.1.5.2	Fluorescenční detektory	45
4.1.5.3	Refraktometrický detektor	46
4.1.5.4	Elektrochemický detektor	46
4.1.5.5	Vodivostní detektor.....	47
4.1.5.6	Hmotnostní detektor	48
4.2	POPIS HPLC ANALÝZY	48
5	MOŽNOSTI STANOVENÍ VITAMÍNŮ SKUPINY B METODOU HPLC	50
5.1	HPLC ANALÝZA NIKOTINAMIDU, PYRIDOXINU, RIBOFLAVINU A THIAMINU V NĚKTERÝCH VYBRANÝCH POTRAVINÁCH	50
5.1.1	Použité suroviny	50
5.1.2	Příprava vzorků	50
5.1.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů.....	50
5.2	STANOVENÍ ZMĚN MNOŽSTVÍ RIBOFLAVINU V MLÉCE A NEMLÉČNÝCH IMITACÍCH MLÉKA PŘI SKLADOVÁNÍ V CHLADU POMOCÍ HPLC	51
5.2.1	Použité suroviny	51
5.2.2	Příprava vzorků	51
5.2.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu.....	51
5.3	STANOVENÍ KYSELINY PANTOTENOVÉ V KOJENECKÉ VÝŽIVĚ VYSOCE ÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ	52
5.3.1	Použité suroviny	52
5.3.2	Příprava vzorků	52
5.3.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu.....	52
5.4	STANOVENÍ VE VODĚ ROZPUSTNÝCH VITAMÍNŮ V KOJENECKÉ VÝŽIVĚ VYSOCE ÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ	53
5.4.1	Použité a suroviny	53
5.4.2	Příprava vzorku	53

5.4.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů.....	53
5.5	STANOVENÍ RIBOFLAVINU A VITAMÍNU B ₆ V MLÉCE A FARMACEUTICKÝCH PREPARÁTECH KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ	54
5.5.1	Použité suroviny	54
5.5.2	Příprava vzorku	54
5.5.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů.....	54
5.6	EXTRAKČNÍ POSTUP PRO HPLC STANOVENÍ THIAMINU, RIBOFLAVINU A VITAMÍNU B ₆ V POTRAVINÁCH	55
5.6.1	Použité suroviny	55
5.6.2	Příprava vzorku	55
5.6.2.1	Postup extrakce pro stanovení thiaminu a riboflavinu.....	55
5.6.2.2	Postup extrakce pro stanovení vitamínu B ₆	56
5.6.3	Chromatografické podmínky stanovení	57
5.6.3.1	Chromatografické podmínky stanovení vitamínu B ₁ a B ₂	57
5.6.3.2	Chromatografické podmínky stanovení vitamínu B ₆	57
5.7	CHROMATOGRÁFICKÉ STANOVENÍ RIBOFLAVINU A JEHO DERIVÁTŮ V JÍDLE	57
5.7.1	Použité suroviny	57
5.7.2	Příprava vzorku	58
5.7.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu.....	58
5.8	FERMENTOVANÁ MLÉKA OBOHACENÁ VITAMÍNY SKUPINY B: STABILITA VITAMÍNŮ A VLIV NA VLASTNOSTI VÝROBKU	59
5.8.1	Použité suroviny	59
5.8.2	Příprava vzorků	59
5.8.3	Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů.....	59
	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK.....	68
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Historický trend spotřeby sýrů, ať už v České republice, či ve světě vykazuje nerovnoměrný, ale neustálý nárůst. S tímto nárůstem spotřeby však vzrůstá i náročnost trhu, který zvyšuje požadavky na sýry v mnoha směrech. Spotřebitel poslední dobou vyžaduje široký sortiment vyráběných sýrů s různými vlastnostmi, ať už chuťovými, vzhledovými či pachovými, ale také s vlastnostmi týkajícími se samotného složení sýrů. Velmi oblíbené jsou u nás tavené sýry, což je důvodem jejich vysoké konzumace, která je dlouhodobě nejvyšší na světě. Velké oblibě se těší i přírodní sýry, a to zejména sýry čerstvé a termizované. Významnou skupinu sýrů z hlediska konzumace tvoří sýry polotvrdé a tvrdé.

Sýry jsou dobrým zdrojem nutričně kvalitních bílkovin, které obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Laktóza je v sýrech obsažena jen v nepatrném množství, při výrobě sýrů z ní vzniká kyselina mléčná. Nepostradatelnou součástí sýrů je také tuk, který obsahuje esenciální nenasycené mastné kyseliny. Nadměrná konzumace sýrů s vyšším obsahem tuků může však vést ke vzniku závažných onemocnění např. obezité nebo zvýšení hladiny cholesterolu v krvi a následně k srdečním chorobám. Sýry jsou také kvalitním zdrojem vitamínů a minerálních látek. Z lipofilních vitamínů je přítomen vitamín A a D, z hydrofilních prakticky všechny vitamíny skupiny B. Vitamíny jsou esenciální látky, které si organismus nedokáže sám syntetizovat, a proto je musí přijímat z vnějších zdrojů. Z minerálních látek je hojně zastoupen vápník, který je důležitý např. pro srážení krve a svalovou činnost.

Technologie výroby sýrů se od dob prvních zmínek o nich posunula již na takovou úroveň, že jsme schopni vyrobit sýr „na míru“; tj. sýr, který obsahuje přesně požadované množství látek nebo sýr, který má definovanou konzistenci apod. Díky tomu jsme schopni vyrobit např. sýr se zvýšeným množstvím vápníku, se sníženým množstvím tuků na přesně požadované procento, či sýr obohacený o nenasycené ω -3 mastné kyseliny.

K tomu, abychom byli schopni vyrobit přesně definované sýry s požadovaným složením či vlastnostmi, potřebujeme znát metody, kterými jsme schopni stanovit parametry a složení sýrů. Jednou z těchto metod je metoda HPLC – Vysoce účinná kapalinová chromatografie. Touto metodou jsme schopni stanovit obsah vitamínů, či jiných organických látek, které

jsou v sýrech zastoupeny pouze ve stopovém množství a k jejich stanovení nelze použít jednodušších metod.

Cílem této práce bylo vybrat některé postupy z metodiky HPLC, kterými by bylo možno stanovit vitamíny skupiny B v sýrech.

1 MLÉKO

Mlékem se nazývá tekutý sekret mléčné žlázy savců. Sekrety mléčné žlázy se dělí na dvě skupiny – mléka nezralá a mléka zralá [1].

Nezralé mléko (mlezivo) je tekutina podobná mléku, ale její složení je značně odlišné. Mlezivo se liší od zralého mléka i svým biologickým obsahem. Je nezbytným krmivem pro novorozená mláďata, zabezpečuje normální rozvoj mladého organismu [2]. Mlezivo není a nesmí být využíváno k průmyslovému zpracování. Přejít z mleziva v mléko zralé trvá průměrně 7 – 10 dní od porodu.

Podle vzájemného poměru kaseinové a albuminové části bílkovin rozlišujeme u zralých mlék mléka albuminová (ženské, psí, kočičí a kobydí) a mléka kaseinová (kravské, kozí, ovčí a velbloudí). V našich podmínkách se průmyslově zpracovává především mléko kravské, v menší míře mléko ovčí a kozí [1].

Z fyzikálně–chemického hlediska je mléko disperzní systém. Skládá se ze dvou základních částí: z vody, tzv. disperzního prostředí a z malých částic rozptýlených v tomto prostředí, nazývaných disperzní fází. U mléka se podle velikosti částic rozlišují fáze molekulární (laktóza a minerální látky), koloidní (bílkoviny) a emulzní (tuk) [2].

1.1 Biologická a výživová hodnota mléka a mléčných výrobků

Mléko a mléčné výrobky patří v našich zemích k oblíbeným potravinám. Pravidelný příjem mléka zaručuje optimální příjem vápníku, esenciálních aminokyselin, zinku, jodu a vitaminů B₂, B₁₂ a vitamínu A. Proto by mléko a mléčné výrobky měly být nedílnou součástí našeho jídelníčku. Strava, která neobsahuje mléko, může vést ke zhoršení fyziologických funkcí a poruchám tělesného a duševního vývoje u dětí. Mléko podporuje optimální vývin kostí a zubů a předchází tak vzniku osteoporózy [3].

Člověk by měl denně přijmout průměrně 0,8 – 1,0 g vápníku, těhotná žena 1,5 g a kojící matka až 2 g [4].

Mléko a mléčné výrobky by v naší stravě měly představovat 2 – 3 porce denně, u dospívajících dětí, těhotných a kojících žen 3 – 4 porce denně (1 porce = 250 ml mléka, 125 ml jogurtu, 30 – 50 g sýra) [5].

1.2 Složky mléka

Podle chemické skladby lze organické a anorganické látky, které se vyskytují v mléce, roztrždit do tří substancí: voda, sušina, plyny [6].

Mléko obsahuje průměrně 87 až 88 hm. % vody, která se v něm vyskytuje jednak volná, jednak vázaná na koloidy a dále i chemicky vázaná. Volná voda tvoří převážnou většinu mléka. Jsou v ní rozpuštěny jeho složky, např. laktóza, minerální látky, kyseliny apod. Voda vázaná na koloidy je hydratační voda, která tvoří obaly na povrchu jejich částic. Chemicky vázaná voda se nazývá krystalická. Sušina zahrnuje všechny látky zbylé po vysušení. Sušinu mléka tvoří mléčný tuk a doprovodné látky, bílkoviny a nebílkovinné dusíkaté látky, mléčný cukr – laktóza a ostatní sacharidy, vitamíny, enzymy, hormony apod. Sušinu tvoří 12 – 13 hm. % mléka v závislosti na jeho složení. Čerstvě nadojené mléko obsahuje průměrně asi 8 obj. % plynů. Převážná část je oxid uhličitý (5 – 7 obj. %). Část plynů se do mléka dostává až po styku se vzduchem (hlavně dusík a kyslík) [2].

1.2.1 Bílkoviny

V mléce se nachází velmi vhodná směs dvou skupin bílkovin: kasein a syrovátkové bílkoviny [1].

Kasein je hlavní bílkovinou mléka. V kravském mléce je obsažen v množství 2,4 až 2,6 %. Tvoří 75 až 79 % celkového dusíku v kravském mléce. Z nepostradatelných aminokyselin obsahuje valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, treonin, metionin, lyzin a tryptofan [6]. Jedná se o komplex frakcí fosfoproteinů. Základními frakcemi kaseinu jsou α_s , β a κ -kasein, ostatní frakce kaseinu se považují za jejich deriváty. Kasein je v mléce vázán na vápník. Zředěnou kyselinou, ať již přidanou nebo vytvořenou mléčným kysáním, se sráží volný kasein při pH 4,6 (pI kaseinu). Působením enzymu *chymosinu* dochází k rozštěpení κ -kaseinu, který tím ztrácí svůj ochranný vliv na ostatní frakce, a veškeré frakce se vysráží ve formě vápenatých solí. Obou těchto způsobů se používá k výrobě sýrů a to buď tzv. kyselých, srážením kaseinu působením kyselin, nebo sladkých, při srážení mléka syřidlem [7].

Po vysrážení kaseinu z mléka při pH 4,6 zůstane v mléčném séru přibližně 0,6 hm. % bílkovin, které se souhrnně nazývají syrovátkové bílkoviny a tvoří přibližně 17 – 20 % z celkového množství bílkovin [2]. V syrovátkových bílkovinách mléka se nachází

α -laktalbumin a β -laktoglobulin. Obsah všech nepostradatelných aminokyselin je s výjimkou metioninu vyšší než v kaseinu. Velmi cenný je vysoký obsah cysteinu a tryptofanu, na který je kasein chudý [1].

1.2.2 Mléčný tuk

Mléčný tuk má velmi komplikované složení a strukturu. Základními složkami jsou: mono-, di- a triacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů, uhlovodíky a v tucích rozpustné vitamíny. Z celkových lipidů mléka však kolem 98 % tvoří triacylglyceroly. Z nasycených mastných kyselin tvoří největší podíl kyselina myristová, palmitová, stearová a z nenasycených kyselina olejová [7] a esenciální mastné kyseliny – kyselina linolová a linolenová [1].

1.2.3 Mléčný cukr

Laktóza se vyskytuje specificky jen v mléce, proto je také nazývána mléčný cukr [7].

Řada vlastností laktózy je důležitých pro mlékářenskou praxi. Především je to její schopnost rozkladu působením bakterií mléčného kvašení, čehož se využívá při výrobě tekutých kysaných mléčných výrobků, tvarohů, sýrů a másla. Na druhé straně je však utilizace laktózy na kyselinu mléčnou při nehygienickém způsobu získávání mléka a jeho nedostatečném vychlazení v prvovýrobě příčinou kysnutí, srážení a znehodnocení mléka.

Při výrobě sýrů přechází laktóza do syrovátky; při výrobě sladkých sýrů téměř ze 100 %, při výrobě kyselých sýrů asi ze 70 %. Vysoká výživná hodnota syrovátky je právě v jejím obsahu laktózy [6].

1.2.4 Minerální látky

Celkový obsah minerálních látek se zjišťuje zpopelněním [6]. Obsah popelovin v kravském mléce kolísá v intervalu od 6 do 8 g.l⁻¹ [7]. V mléce jsou obsaženy soli anorganické a organické. Z celkového obsahu solí je asi 40 % fosforečnanů, 20 % chloridů a 5 % oxidu vápenatého. Organické soli jsou zastoupeny citronany, a to asi z 35 %. Z nejdůležitějších prvků obsahuje mléko vápník, fosfor, dále hořčík, sodík, draslík a chlor. Ze stopových prvků mléko obsahuje měď, zinek, železo a mangan [6].

Tab. 1. Obsah hlavních minerálních látek v mléce [7]

Prvek	Obsah v mléce ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	
	Průměrná hodnota	Interval
Ca	1,21	0,90 – 1,40
P	0,95	0,70 – 1,20
K	1,50	1,00 – 2,00
Na	0,47	0,30 – 0,70
Cl	1,03	0,80 – 1,40
Mg	0,12	0,05 – 0,24
S	0,32	0,20 – 0,40

1.2.5 Vitamíny

V mléce jsou přítomny veškeré vitamíny, i když koncentrace některých je pouze minimální [7]. Původní obsah vitamínů v mléce po nadojení se cestou ke spotřebiteli často snižuje, a to i o více než 50 %, hlavně vlivem nešetrného ošetřování nebo při technologickém zpracování. Mléko obsahuje vitamíny rozpustné jak ve vodě, tak i v tuku, obsahuje relativně vysoký obsah vitamínu A i jeho prekurzoru β -karotenu. Mléko je důležitým zdrojem ve vodě rozpustného vitamínu B₂ (riboflavinu) a vitamínu B₁₂ (kyanokobalaminu) a poměrně dobrým zdrojem vitamínu B₁ (thiaminu), B₆ (pyridoxinu) a biotinu [1]. Přehled o průměrném obsahu jednotlivých vitamínů v mléce, a pro srovnání v másle a sýrech, udává následující tabulka 2 [7].

Tab. 2. Průměrné obsahy vitamínů v mléce a sýrech [7]

Vitamin	Obsah vitamínů (mg . kg ⁻¹)	
	Mléko	Sýr
A	0,3 – 1,0	1,6 – 3,2
Provitamín A	0,1 – 0,6	0,3 – 0,8
Thiamin	0,3 – 0,7	0,2 – 0,6
Riboflavin	0,2 – 3,0	3,3 – 5,7
Pyridoxin	0,2 – 2,0	0,4 – 0,8
Korinoidy	0,003 – 0,038	0,006 – 0,017
Niacin	0,8 – 5,0	0,3 – 16,0
Kyselina listová	0,03 – 0,28	0,08 – 0,82
Kyselina pantotenová	0,4 – 4,0	2,9 – 4,0
C	5 – 20	---
D	0,001	0,008
E	0,2 – 1,2	3,0 – 3,5
K	0,01 – 0,03	---
Biotin	0,01 – 0,09	0,02 – 0,05

1.2.6 Enzymy

V kravském mléce byl detekován velký počet enzymů. Enzymy jsou jednak syntetizovány v mléčné žláze, ale některé se dostávají do mléka z krve. Kromě nativních enzymů obsahuje nadojené mléko i mikrobiální enzymy z kontaminující mikroflóry. V mléce se nacházejí tyto enzymy: *laktoperoxidáza*, *xantinoxidáza*, *kataláza*, *lipázy*, *fosfatázy*, *proteázy*, *amylázy* a *lysozym* [7].

1.3 Technologicky významné vlastnosti mléka

1.3.1 Kyselost

Z technologického hlediska je nejvýznamnější obsah a formy vápníku v mléce, protože aktivita Ca^{2+} významně ovlivňuje koloidní stabilitu kaseinu, tedy jednak termostabilitu mléka a jednak sladké srážení mléka a vlastnosti syřeniny při výrobě sýrů.

Celkový obsah vápníku v mléce je průměrně 120 mg.l^{-1} , 30 % je přítomno v rozpustné formě v mléčném séru především jako hydrogenufosforečnan a citrát, ovšem méně než 10 % z celkového množství vápníku je v disociované formě. Převážná část vápníku je pak v mléce přítomna v nerozpustné formě, tzv. koloidního fosforečnanu vápenatého [8].

1.3.2 Kysací schopnost

Kysací schopnost je rozhodujícím kritériem zda v mléce bude zajištěn dobrý růst přidaných čistých mlékařských kultur. Mléko musí obsahovat všechny potřebné složky pro rozvoj přidaných kultur a nesmí obsahovat žádné látky, které tento rozvoj potlačují (inhibiční látky – specifické – imunoglobuliny a nspecifické – *lysozym*, laktoferin, transferin a další).

Dalším faktorem, který ovlivňuje kysací schopnost, je jeho následné ošetření po nadojení. Vlivem chlazení mléka dochází k fyzikálně–chemickým změnám, rozpadu kaseinových micel, zmenšení jejich stupně hydratace, ke změnám v rovnováze jednotlivých forem minerálních látek a ke zvyšování pH. V důsledku těchto změn dochází i ke zhoršování růstu většiny bakterií mléčného kysání.

1.3.3 Syřitelnost

Pro sýrařskou technologii je důležitým kritériem syřitelnost, tj. schopnost srážet se syřidlem a tvořit syřeninu požadovaných vlastností. Proces srážení mléka syřidlem probíhá ve dvou fázích. V primární fázi dochází pouze k limitní proteolýze κ -kaseinu, v sekundární fázi ke koagulaci frakcí kaseinu za přítomnosti vápenatých iontů. Syřitelnost je ovlivněna celou řadou faktorů souvisejících s chemickým složením mléka a variabilitou jeho složek. Nejvýznamnější faktory jsou obsah kaseinu a zastoupení jeho frakcí, velikost a stav kaseinových micel, obsah a formy vápníku a fosforu v mléce, zejména rovnováha kalcium

kaseinátového – kalcium fosfátového komplexu, případně i další minerální látky, pH mléka a teplota.

1.3.4 Tepelná stabilita

U řady technologických postupů, jako je vysoká pasterace, krátkodobý záhřev při vysokých teplotách (UHT, Ultra High Temperature, ultra vysoká teplota) nebo klasická sterilace, je důležitou podmínkou zpracovatelnosti mléka jeho dobrá tepelná stabilita, neboli relativní odolnost mléčných bílkovin proti vysrážení při záhřevu. Ze souborů vlivů působících na tepelnou stabilitu mléka je nejvýznamnější jeho složení, zejména skladba bílkovin, minerálních látek a jejich vzájemné vztahy. Bílkoviny mléčného séra (imunoglobuliny) jsou vůči tepelnému záhřevu citlivější než frakce kaseinu. Tepelná stabilita je dávana do souvislosti s rovnováhou mezi obsahem vápníku a hořčíku (jako zásadité složky) a aniontů kyseliny fosforečné a citrónové (jako kyselé složky). Významný vliv hraje i pH mléka, změny rovnováh v mléce v důsledku skladování při nízkých teplotách [7].

1.4 Mléko jako surovina k výrobě sýrů

Rozhodujícím činitelem při výrobě sýrů je jakost zpracovaného mléka. Požadavky na jakost mléka jsou podle jednotlivých druhů sýrů rozdílné. Kyselé a obyčejné sladké sýry nevyžadují mléko po všech stránkách tak jakostní jako některé druhy jemných sladkých sýrů, zejména tvrdé sýry s vysoko dohřívanou sýřeninou. Jakostí mléka se rozumí jeho chemické složení, chuťové a aromatické vlastnosti a také množství a druhy mikroorganismů, které se v něm nacházejí.

Na těchto vlastnostech závisí syřitelnost mléka, tj. schopnost mléka k syření a k tvorbě pevné sýřeniny, a kvasnost mléka, tj. schopnost mléka vytvářet vhodné prostředí pro rozvoj a činnost užitečných mikroorganismů, především bakterií mléčného kysání [9].

1.4.1 Požadavky kladené na jakost mléka z hlediska jeho chemického složení a fyzikálních vlastností

Složení mléka není konstantní a mění se v průběhu laktační doby a místa produkce i u zdravých, dobře živených dojnic. Největší změny nastávají v obsahu tuku a bílkovin, nejmenší u cukrů a popelovin. Při výrobě sýrů je nejdůležitější obsah bílkovin, zvláště obsah kaseinu, neboť na jeho obsahu a tučnosti mléka je závislá výtěžnost [10]. Čím

tučnější je mléko, tím vyšší je obsah bílkovin v mléce a tím méně se spotřebuje k výrobě 1 kg sýra.

Kromě tuku a bílkovin mají pro výrobu sýrů největší význam rozpustné vápenaté soli, které mají příznivý vliv na syřitelnost mléka a vlastnosti sýřeniny a celkový obsah vápníku, který je důležitý pro vazbu kyseliny mléčné během technologického postupu. Kromě doby laktace působí na obsah vápníku v mléce krmivo a složení půdy.

Na chemické složení mléka má nepříznivý vliv zdravotní stav dojnice a nevhodné krmení.

Fyzikální vlastnosti mléka těsně souvisí s jeho složením, především krmivo a zdravotní stav dojnic mění složení mléka, mění i jeho fyzikální vlastnosti (hustota, apod.) [11].

1.4.2 Požadavky kladené na jakost mléka z hlediska mikrobiologické čistoty

O jakosti a vhodnosti mléka pro výrobu jednotlivých druhů sýrů z hlediska bakteriální čistoty rozhoduje nejen počet mikroorganismů v mléce, ale především jejich druh. Čerstvě nadojené mléko nemá obsahovat více než 100 000 mikroorganismů v 1 ml (30 °C), žádné patogenní bakterie, žádné hnilobné bakterie, dále bakterie máselného kvašení (sporotvorné) a plynotvorné. Sporotvorné bakterie máselného kvašení a ostatní sporotvorné bakterie způsobují největší potíže při výrobě tvrdých sýrů, neboť způsobují velké škody na jejich jakosti a znesnadňují zpracování takových sýrů na sýry tavené [10,12].

Po mikrobiologické stránce mohou být některá krmiva zdrojem mikroorganismů škodlivých mléku. Mikrobiologickou kvalitu mléka ovlivňuje také čistota při dojení a další ošetřování mléka po nadojení [9].

2 SÝRY

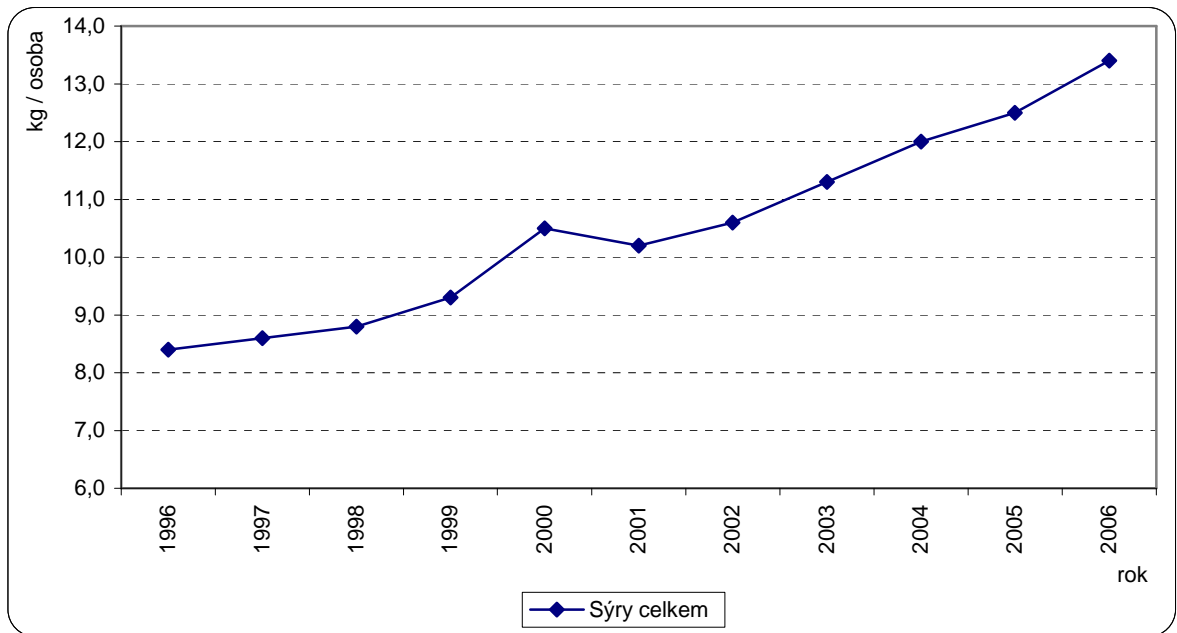
Sýry patří k nejhodnotnějším potravinám z pohledu svého složení. Podle standardu FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Organizace pro výživu a zemědělství/Světová zdravotnická organizace) z roku 1963 jsou sýry definovány takto:

Sýr je mléčný výrobek vyrobený srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Principem je oddělení určitého podílu syrovátky ze sraženiny mléka stanovené tučnosti.

Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotné výrobky obsahující všechny esenciální aminokyseliny. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a mléčný tuk [13]. Různé druhy sýrů se vyznačují vysokým obsahem minerálních látek, z nichž přední místo zaujímá vápník, důležitý a nezbytný pro růst a zdraví kostí. Neméně důležité jsou ale i další látky jako fosfor, hořčík, sodík, draslík, aj. [14]. U tučných sýrů je přítomen vitamín A a D, u všech druhů vitaminy skupiny B [13]. Sýr je tedy potravinou, která zůstane trvalou součástí stravy dnešní populace, a to vytváří pro zpracovatele mléka skvělé šance a příležitosti do budoucna.

V roce 2004 bylo v České republice vyrobeno 148,6 tis. tun sýrů a tvarohů; v roce 2005 výroba především z důvodů významného dovozu ze zemí Evropské Unie poklesla o téměř 5 % na pouhých 141,2 tis. tun. Spotřeba sýrů v České republice, stejně tak jako výroba, jde ruku v ruce s celosvětovými vývojovými trendy. V roce 2007 byla u nás dosažena zatím historicky nejvyšší spotřeba sýrů a tvarohů, a to ve výši 17,1 kg na osobu [15]. Spotřeba u nás sice nedosahuje úrovně největších světových konzumentů sýrů (Řecko 29 kg, Francie 25 kg, Německo 22 kg), je ale jednoznačně nejvyšší ze zemí střední a východní Evropy a předčí i řadu významných mlékařských zemí (Velká Británie, Španělsko, Austrálie, Nový Zéland) [14].

Na celkové spotřebě 17,1 kg se přírodní sýry podílejí hodnotou 11 kg (64 %), tavené sýry 2,7 kg (16 %) a konzumní tvarohy 3,4 kg (20 %) [15].



Obr. 1. Spotřeba sýrů v ČR v letech 1996 – 2006 [16]

2.1 Rozdělení sýrů

Sýry je možné dělit podle řady hledisek:

Podle použité suroviny se sýry dělí na:

1. přírodní sýry, tj. klasické sýry, vyráběné přímo z mléka
2. tavené sýry, které jsou vyráběny dalším zpracováním přírodních sýrů
3. sýry, ve kterých je mléčný tuk nahrazen rostlinnými
4. imitace sýrů, které jsou připravovány rekonstitucí jednotlivých složek mléka

Podle druhu použitého mléka se sýry dělí na:

1. kravské
2. ovčí
3. kozí apod.

Podle obsahu sušiny se sýry dělí na:

1. extra tvrdé (méně než 47 %)
2. tvrdé (obsah vody 47 – 54,9 %)

3. polotvrdé (55,0 – 61,9 %)

4. poloměkké (62 – 68 %)

5. měkké (více než 68 %)

Podle procentického obsahu tuku v sušině se sýry dělí na:

1. vysokotučné (nad 60 % tuku)

2. plnotučné (45 – 60 %)

3. polotučné (25 – 45 %)

4. nízkotučné (10 – 25 %)

5. odtučněné (pod 10 %)

Podle obsahu vody v tukuprosté sušině se sýry dělí na:

1. měkké (minimálně 67 %)

2. polotvrdé (54 – 69 %)

3. tvrdé (49 – 56 %)

4. extra tvrdé (méně než 51 %)

Podle způsobu srážení mléka se sýry dělí na:

1. kyselé sýry – při výrobě se uplatňuje pouze kyselé srážení. Do této skupiny patří průmyslový tvaroh a z něj vyráběné Olomoucké tvarůžky.

2. sladké sýry – při srážení mléka se uplatňuje jen působení syřidla. Patří sem polotvrdé a tvrdé sýry.

3. sýry se smíšeným srážením mléka vlivem kyseliny mléčné a syřidla. Do této skupiny patří měkké sýry a tvarohy a tato skupina se běžně řadí mezi sladké sýry.

Podle způsobu zrání se sýry dělí na:

1. nezrající sýry (čerstvé, termizované)

2. sýry zrající na povrchu, s mazem na povrchu, v celé hmotě

3. sýry zrající (plísňové) s tvorbou charakteristické plísně na povrchu, s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty [13]

Podle technologie výroby se sýry dělí na:

1. Sýry přírodní

A. sýry sladkého sýrařství:

- čerstvé sýry – sýry, u kterých neprobíhá zrání (např. smetanový sýr)
- měkké sýry – sýry rozdělené do dalších podskupin podle použité čisté kultury, která je především nositelem sensorických vlastností, většinou jsou nelisované:
 - sýry zrající v chladu (např. Zlato)
 - sýry zrající pod mazem (např. Romadur)
 - sýry s bílou plísní na povrchu (např. Hermelín)
 - sýry s modrozelenou plísní uvnitř těsta (např. Niva)
 - sýry s kombinovaným nárůstem plísně (např. Vltavín)
- bílé sýry – sýry nezrající díky vysokému obsahu NaCl, uchovávané v solném roztoku:
 - sýry nelisované (např. Balkánský sýr)
 - sýry lisované (např. Akawi)
 - sýry pařené (např. Jadel)
- pařené sýry – v průběhu technologie se sýry „paří“, čímž získává finální výrobek vláknitou strukturu
- tvrdé sýry – zvýšené sušiny se docílí vyšší teplotou zpracování, než byla teplota sýřící:
 - sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (sýry holandského typu, např. Eidam cihla)
 - sýry s vysokodohřívanou sýřeninou tvořící oka (sýry ementálského typu, např. Primátor)
 - sýry s vysokodohřívanou sýřeninou netvořící oka (sýry parmezánského typu, např. Grand Moravia)
 - sýry s vysokodohřívanou mletou sýřeninou (sýry čedarového typu)
- ostatní výrobky (např. sladký kasein)

B. sýry kyselého sýrařství:

- tvarohy
- kyselé sýry zrající pod mazem
- ostatní výrobky

2. Přepřacované

- tavené
 - druhové
 - směsné
- sušené [17]

2.2 Technologie výroby sladkých sýrů

Mezi sladké sýry řadíme všechny přírodní sýry, u nichž ke srážení mléka používáme enzymů obsažených v syřidle. Proces srážení trvá průměrně 20 – 120 minut. Za tuto dobu vzniklá sýřenina nestačí prokysat a má chuť sladkého mléka. K prokysání dochází z větší části během dalšího zpracování.

Technologické operace při výrobě sladkých sýrů probíhají následovně: tepelné ošetření mléka, úprava před zpracováním, syření, zpracování sýřeniny, formování a lisování sýrů, solení a zrání [13].

Tento jednoduchý postup má však tolik obměn, kolik je druhů sladkých sýrů. Rozmanitost výroby spočívá v tom, že lze pro každý druh sýra provádět tyto jednotlivé úkony jinak nebo některé i vynechat. Změna nebo vynechání úkonu znamená změnu výrobního procesu, a tím i změnu složení a vlastností zralého sýra [18].

2.2.1 Tepelné ošetření mléka

Pasterace mléka zajišťuje zdravotní nezávadnost sýrů. Pro výrobu sýrů se nejčastěji používá šetrná pasterace (72 °C po dobu 15 s). Vyšší pasterační záhřevy jsou nevhodné, protože se zhoršuje syřitelnost mléka a oddělování syrovátky [8].

2.2.2 Úprava mléka před sýřením

Úprava složení mléka se týká úpravy tučnosti mléka z hlediska požadavku standardizace obsahu tuku v sušině sýra a úpravy rozpustných vápenatých solí po pasteraci (nejčastěji přidávkem chloridu vápenatého). Mikrobiální život mléka se upravuje přidáním mikrobiálních čistých kultur v různých dávkách (podle druhu vyráběného sýra) a nechají se pomnožit.

2.2.3 Sýření mléka

Působením syřidlového enzymu *chymosinu* nebo *pepsinu* na mléko se molekula kaseinu rozkládá na dvě molekuly parakaseinu a vzniká tuhá sýřenina, která je základem výroby sladkých sýrů. Používané syřidlo je výtazek ze sušených žaludků sajících telat, která ještě nepřijímala žádnou pevnou potravu [18].

2.2.4 Zpracování sýřeniny

Zpracování sýřeniny zahrnuje řadu operací podle jednotlivých typů sýrů. U měkkých sýrů je zpracování sýřeniny jednoduché a postačuje pokrájení sýřeniny a šetrné nalévání do forem. U tvrdých sýrů je zpracování náročné, vyžaduje vlastní krájení, odpouštění syrovátky s případným napouštěním prací vody, přihřívání a dosoušení [13].

2.2.5 Formování, odkapávání a lisování sýrů

Každý druh sýra má svůj standardní tvar a velikost (bochníkový, hranatý, válcovitý, kulovitý apod.). Sýry se formují v tvořítkách, v nichž také odkapávají (samovolné uvolňování syrovátky jen tlakem vlastní váhy sýrů) nebo se lisují (vytlačováním syrovátky u tvrdých sýrů zvýšeným tlakem pod lisy). Během formování sýřenina dále prokysává a mléčný cukr se mění na kyselinu mléčnou [18].

2.2.6 Solení sýrů

Solení je nezbytná operace všech druhů tvarovaných a zrajících sýrů. Solení zpevňuje povrch sýra, reguluje obsah vody v těstě sýra, což má návaznost na konzistenci těsta a mikrofloru, průběh kysání a zrání [13].

Sýry se solí třemi způsoby. Solí se buď přímo syřenina ve vaně nebo při formování, tj. solení v těstě, anebo se solí až hotové sýry po zformování, a to buď v koncentrovaném roztoku soli – solení v solné lázni nebo se prospává povrch sýrů suchou solí a ta se pak vtírá – tzv. solení na sucho. Volba způsobu solení závisí na druhu sýra a jeho požadavku na solení [11].

2.2.7 Zrání sýrů

Zrání lze definovat jako veškeré biochemické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, případně syřidlových enzymů. Zrání sýrů ovlivňuje vzhled, chuť, vůni a konzistenci sýra. Během zrání podléhají největším změnám laktóza a mléčné bílkoviny, u některých sýrů také tuk.

Biochemické procesy probíhající v sýrech je možné rozdělit do tří základních fází, které na sebe plynule navazují:

1. První fáze: Dochází k rozkladu laktózy bakteriemi mléčného kysání za vzniku kyseliny mléčné. Hlavní rozklad laktózy nastává v průběhu formování sýrů, během odkapávání a lisování sýrů je nejintenzivnější. Pokud není dokysání dokončeno při lisování, sýry se ukládají po vyjmutí z tvořítek na police do temperované místnosti k dokysání.
2. Druhá fáze: Dochází ke snížení kyselosti sýra jednak vazbou kyseliny mléčné na rozkladné produkty bílkovin a jednak jejím mikrobiologickým rozkladem na kyselinu propionovou, CO₂ a vodu, případně i další sloučeniny.
3. Třetí fáze: V této fázi probíhá proteolýza bílkovin, a to anaerobně v celé hmotě nebo aerobně od povrchu dovnitř.

Zrání sýrů probíhá ve zracích sklepích. Optimální podmínky teploty a relativní vlhkosti jsou dány pro typ sýra. Doba zrání sýrů se pohybuje od 24 hodin (čerstvé sýry solené), po dobu několika dnů (Romadur, Hermelín), týdnů (Zlato, Niva), až měsíců (Moravský bochník, Ementál) [13].

2.3 Popis jednotlivých druhů sladkých sýrů

2.3.1 Čerstvé sýry

Do skupiny čerstvých sýrů patří sýry, jejichž výroba je ukončena u některých druhů prokysáváním sýřeniny, u ostatních vysolením. Sýry se konzumují v čerstvém stavu, nenastává u nich hlubší rozklad bílkovin (odpadá úplně zrání sýrů). Tyto sýry si zachovávají čistou mléčnou chuť, mírně nakyslou. Do skupiny čerstvých sýrů patří:

1. čerstvé sýry nesolené – pomazánky, krémový sýr
2. čerstvé sýry solené – cottage [11]

2.3.2 Měkké sýry

Charakteristickým znakem je měkká, soudržná až drobivá konzistence. Při jejich výrobě se sýřenina ve většině případů pouze krájí, nepřihřívá ani nedosouší, syrovátka se odlučuje bez lisování [13].

1. Sýry zrající v chladu – typické svojí slámovou barvou a špekovitou konzistencí, v průběhu technologie se paří, zrání probíhá rovnoměrně v celé hmotě a při nízkých teplotách (6 – 10 °C). Patří sem např. Zlato a italský sýr Bel Paese [17].
2. Sýry zrající pod mazem – typické oranžovohnědým „mazem“ na povrchu, který vytváří bakterie *Brevibacterium lines*. Tyto bakterie způsobují proteolýzu od povrchu sýra dovnitř hmoty, důsledkem je uvolňování čpavku způsobující typické aroma [17]. Do této skupiny patří Romadur, dezertní sýr, francouzský Livarot nebo Sant Paulin [13].
3. Sýry zrající s plísní se podle způsobu nárůstu a druhu použité plísně dělí na:

Sýry s plísní na povrchu – charakteristické vatovitým myceliem plísně *Penicillium camemberti* a *Penicillium candida* na povrchu sýra, která způsobuje v průběhu zrání proteolýzu od povrchu dovnitř, ale také typické houbové aroma, připomínající žampiony [17]. Typickými představiteli jsou Camembert, De Brie. U nás jsou vyráběny pod názvy Hermelín, Sázavský sýr [13].

Sýry s plísní v těstě – typické mramorovitým nebo stromečkovitým nárůstem modré nebo modrozelené plísně *Penicillium roqueforti*. Je nutné jí vytvořit během zrání aerobní podmínky propíchnutím celé hmoty sýra. Při zrání kromě proteolýzy probíhá i lipolýza

udělující sýru charakteristickou chuť [17]. Představiteli jsou francouzský Roquefort, italská Gorgonzola, u nás Niva [13].

Sýry s kombinovaným nárůstem plísně, do této skupiny patří např. Vltavín [17].

2.3.3 Polotvrdé a tvrdé sýry

Skupiny polotvrdých a tvrdých sýrů se od sebe liší technologickými odlišnostmi, ale hlavně svojí velikostí, tvarem a chuťovými zvyklostmi. K nejčastěji vyráběným polotvrdým sýrům patří sýry holandského typu, z tvrdých sýrů jsou to sýry ementálského typu. Značný podíl sýrařské produkce tvoří Čedar – sýr na hranici mezi tvrdými a polotvrdými sýry [17].

1. Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou – typické pro tuto skupinu sýrů je dohřívání a dosoušení sýřeniny při teplotě 34 – 42 °C [13]. Hlavním technologickým znakem je odčerpání části syrovátky v průběhu zpracování zrna a její nahrazení horkou „prací“ vodou. Sýry se vyrábějí o hmotnosti 0,3 – 20 kg ve tvaru bochníku, cihly, koule, salámu nebo bloku, jejich chuť je příjemně mléčně nakyslá, jemně sýrovitá, barva krémová, konzistence celistvá, na řezu jsou drobná očka velikosti hrachu [17]. Svůj původ mají v Holandsku, u nás se vyrábějí sýry s označením Eidamská cihla, Gouda, Eidamský blok [13].

2. Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou – hlavním technologickým znakem je vysoká teplota dohřívání zrna při jeho zpracování 45 – 55 °C, použití termofilních sacharolytických kultur a bakterií propionového kvašení, které vytváří pro sýr charakteristická pravá oka velikosti ořechu. Jejich chuť je nasládlá, jemně oříšková, konzistence drobivá [17]. Typickými zástupci této skupiny jsou Ementál, Moravský blok.

2.3.4 Pařené sýry

Mezi pařené sýry patří sýry zahrnuté ve skupině měkkých nebo tvrdých sýrů, ale vzhledem ke speciálnímu zpracování sýřeniny se obvykle uvádějí samostatně.

Pro pařené sýry je charakteristické, že mírně prokysaná sýřenina (pH 5,0 – 5,2) se zpracováním v horké vodě stává plastickou, což umožňuje rozmanité tvarování sýrů. Vylisovaná a prokysaná sýřenina se krájí na kostky, které se dopravují do pařicího stroje, kde sýr změkne a zvláční. Do pařicí vody je možné dodat stanovené množství soli, sýry se částečně vysolí. Napařená surovina se tvaruje, poté se rychle vychladí a solí na sucho nebo v solné lázni [13].

2.4 Technologie výroby kyselých sýrů a tvarohů

Podle způsobu srážení mléka se tvarohy rozdělují do dvou skupin. Jednu skupinu tvoří tvarohy, při jejichž výrobě se uplatňuje pouze kyselé srážení bez přídavku syřidlových enzymů – označované jako tzv. kyselé sýry. Takto je vyráběn tvaroh na strouhání (tvrdý tvaroh) a tvaroh průmyslový, který je základní surovinou pro výrobu kyselých sýrů. Při výrobě ostatních tvarohů se uplatňuje působení syřidlových enzymů i srážení vlivem kyseliny mléčné.

2.4.1 Technologie výroby tvrdého tvarohu

Tvrdý tvaroh se vyrábí o sušiny 32 %. Je určen pro přímou konzumaci nebo pro zpracování (průmyslový tvaroh) [13]. Mléko se sráží dvoutepelným způsobem při teplotách 22 – 28 °C a po dosažení určité kyselosti se sraženina přihřeje a dále zpracuje. U průmyslového tvarohu se používá i jednotepelný způsob, při němž je tvorba kyseliny mléčné i srážení rychlejší a probíhá i při vyšších teplotách, 32 – 40 °C. Sraženina se přímo zpracovává [11].

2.4.2 Technologie výroby měkkého tvarohu

Při výrobě měkkého tvarohu se na srážení podílí vedle čistých mlékařských kultur i syřidlo. Vzniklá sraženina mléka se již nepřihřívá a syrovátka se odstraňuje samovolným odfiltrováním přes tkaninu a šetrným lisováním nebo odstředěním [13].

Odlišnou technologií se vyrábí termotvaroh. Použitím vyšších teplot pasterace (90 – 96 °C) s delší dobou výdrže (5 – 6 min), použitím jiných druhů ČMK (čistá mlékárenská kultura) a hlavně termizací před zpracováním koagulátu se docílí zachycení až 50 % sérových bílkovin [17].

2.4.3 Technologie výroby kyselých sýrů

U nás jsou to Olomoucké tvarůžky a Olomoucké tyčinky [13]. Tyto sýry jsou jediným původním českým sýrem. Výrobě tvarůžek předchází výroba suroviny – průmyslového tvarohu. Vlastní výroba začíná smísením čerstvého a skladovaného tvarohu, úpravou obsahu sušiny (32 %), NaCl (4,5 %), přídavkem bakteriální a kvasinkové kultury a neutralizačních solí. Směs se rozeemele, homogenizuje a tvaruje do požadovaného tvaru – tvarůžky malé, velké věnečky nebo tyčinky. Ty se poté suší (2 – 4 dny, 20 – 30 °C, vlhkost

80 – 85 %). Ochlý, křisovitý povlak se odstraní praním, takto ošetřené tvarůžky se nechávají zrát 3 – 4 dny při teplotě 17 – 21 °C. Dochází k postupnému rozvoji kultury *Brevibacterium linens* a prozírání hmoty od povrchu dovnitř [17].

2.5 Technologie výroby tavených sýrů

Tavené sýry se vyrábějí mletím, mísením a emulgací přírodních sýrů a jiných surovin s přidávkem tavících solí při vyšších teplotách (85 – 89 °C, 125 – 135 °C nebo u kontinuálních technologií až 140 °C). Tavením přechází směs do tekutého stavu, ochlazením tuhne a vytváří novou strukturu. Podle složení směsi a charakteru přidaných tavících solí může mít tavený sýr konzistenci roztíratelnou nebo lomivou.

Suroviny pro výrobu tavených sýrů tvoří jednak suroviny mléčkárenského původu – přírodní sýry (hlavně sladké sýry, ale i tvaroh), ale i ostatní produkty mléčkárenského původu (máslo, smetana, zahuštěné mléko aj.) a suroviny nemléčkárenského původu – suroviny k ochucení tavených sýrů, např. výrobky masného průmyslu (uzené maso, šunka, klobásy), houby (žampiony, Hlíva ústříčná), zelenina (kapie, česnek, cibule, pažitka) a také koření. Nezbytnou součástí tavených sýrů jsou tavící soli. Jsou to soli slabých kyselin (citronové, fosforečné) a alkalických kovů – Na⁺ a K⁺. Tyto soli zaměňují Ca²⁺ ve struktuře kaseinu, což umožňuje jeho bobtnání a brání srážení bílkovin. Dále slouží jako emulgátory, stabilizátory a látky upravující pH. Soli citrátové mají schopnost výměny Ca²⁺ menší, proto se používají pro výrobu tavených sýrů s tužší lomivou konzistencí, naopak fosfátové soli se používají k výrobě roztíratelných tavených sýrů [17].

3 FYZIOLOGIE VITAMÍNŮ SKUPINY B

Mezi živiny požadované z důvodu mnoha základních fyziologických funkcí potřebných k životu patří vitamíny. Na rozdíl od jiných skupin živin, vitamíny nemají stavební funkci, ani jejich katabolismus neposkytuje energii.

Z hlediska funkce může být vitamín definován následovně:

- jako organická látka odlišná od tuků, sacharidů a bílkovin
- jako přírodní složka potravin, ve kterých je obvykle zastoupen v nepatrném množství
- v nepatrném množství je základem pro fyziologické funkce (např. růst, vývoj aj.) [19]
- jako exogenní faktor, který může získávat určitý heterotrofní organismus pouze z vnějších zdrojů (potravou)
- působí již v malých koncentracích, které jsou neporovnatelné s kvantitativní potřebou základních živin (tuky, sacharidy, bílkoviny), působí jako biokatalyzátor
- sám nebo jeho metabolit (koenzym) urychluje přeměnu látek (i energie), a proto je pro normální životní funkce dotyčných organismů nepostradatelný [20]

Mezi jednotlivými vitamíny neexistují po stránce chemické žádné strukturní vztahy, podle kterých by mohly být klasifikovány. Důležitým rozlišovacím znakem vitamínů je jejich rozpustnost. Podle té se dělí na vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní) a na vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní) [21]. Hydrofilní vitamíny nebývají zpravidla v organismu vůbec skladovány a jejich přebytek je vyloučen močí, naopak lipofilní vitamíny jsou skladovány v játrech.

Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří:

- vitamín A (retinol) a jeho provitamíny (karotenoidy)
- vitamín D (klaciferoly)
- vitamín E (tokoferoly a tokotrienoly)
- vitamín K (fylochinony, farnochinony)

Mezi vitamíny rozpustné ve vodě řadíme:

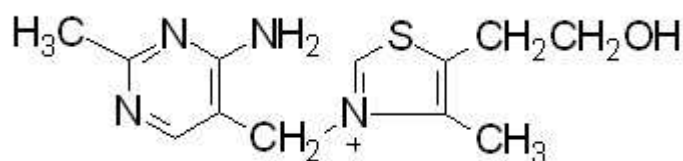
– skupina vitamínů B–komplexu:

- vitamín B₁ (thiamin)
- vitamín B₂ (riboflavin)
- vitamín B₃ (kyselina nikotinová a její amid)
- vitamín B₅ (kyselina pantotenová)
- vitamín B₆ (pyridoxin)
- vitamín B₉ (kyselina listová)
- vitamín B₁₂ (kyanokobalamin)
- biotin

– vitamín C (kyselina L–askorbová a L–dehydroaskorbová) [22]

Nedostatek každého vitamínu se projevuje u živých organismů chorobnými příznaky, které se v lehčích formách označují jako hypovitaminóza, v těžších jako avitaminóza. Nejčastějšími příčinami hypovitaminózy a avitaminózy jsou nedostatek vitamínů v potravě (např. změny obsahu vitamínů při skladování, konzervaci apod.), nedostatečná resorpce vitamínů v zažívacím traktu (např. onemocnění zažívací soustavy), zvýšená potřeba vitamínů v organismu (gravidita, rekonvalescence) a vliv antivitaminů [23]. Nadbytek některých vitamínů se označuje jako hypervitaminóza. U nás se s ní prakticky nesetkáváme, příčina hypervitaminózy je většinou spojována s nadměrným přísunem vitamínů pomocí doplňků stravy [22].

3.1 Vitamín B₁ – thiamin



thiamin

V přítomnosti oxidačních činidel např. H_2O_2 , I_2 , se v zásaditém prostředí oxiduje na thiochrom nebo až na thiamindisulfid [22]. Vitamín B_1 se v živém organismu nachází ve dvou biologicky aktivních formách a to jako thiamindifosfát (TDP) a thiamintrifosfát (TTP) [21]. TDP má zásadní úlohu v metabolismu sacharidů [24]. Druhá aktivní forma TTP, působí v nervech a pravděpodobně i ve svalech při aktivaci kanálu chloridových iontů [22].

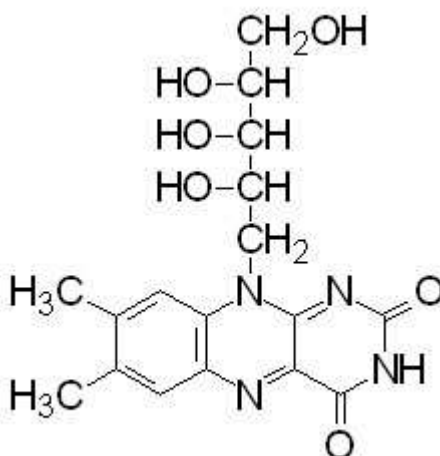
Vitamín B_1 se vyskytuje jak v rostlinných surovinách, kde se nachází převážně ve volné formě, tak i v živočišných produktech, kde je vázán ve formě TDP [21]. Kvasinky a vepřové maso jsou nejvíc koncentrovaným zdrojem thiaminu [25]. Thiamin je v mase poměrně nestabilní. Jedním z důvodů je vysoké pH masa ($\geq 5,5$), dalším důvodem je, že velká část thiaminu se v mase vyskytuje jako TDP, který je citlivější k ničení než volný thiamin [26]. Cenným zdrojem pro člověka jsou cereální výrobky, zejména celozrnné, dále pak játra, srdce, ledviny, mléko a mléčné výrobky a luštěniny [22].

Chronický nedostatek thiaminu vede k závažným neurologickým příznakům, včetně poruchy koordinace pohybů a mentální zmatenosti [27]. Avitaminóza vitamínu B_1 vede k onemocnění beri-beri [22]. Jednou z dalších nemocí spojených s nedostatkem thiaminu je Wernicke–Korsakoffův syndrom. Toto onemocnění se nejčastěji vyskytuje u chronických alkoholiků [27]. Toxicita thiaminem je velmi nízká, takže se hypervitaminóza prakticky nevyskytuje.

Současná doporučená tabulková výživová dávka thiaminu pro průměrného obyvatele ČR činí $1,1 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ [22].

3.2 Vitamín B_2 – riboflavin

Působením UV paprsků se riboflavin rozkládá za vzniku lumichromu (kyselé nebo neutrální pH) nebo lumiflavinu (zásadité pH). U mnoha nápojů, jako jsou šumivá a bílá vína, pivo, mošt, mléko a ovocné džusy bývá popisován, vznik nepříjemné chuti. Tato příchut' je zapříčiněna světelnou degradací metioninu a cysteinu za přítomnosti riboflavinu, který funguje jako světelný senzibilizátor a oxidační agent [29].

**riboflavin**

V biochemických systémech se vyskytuje volný nebo vázaný ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Téměř vždy se vyskytuje jako součást flavinových kofaktorů flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadenindinukleotidu (FAD) [22]. Volný riboflavin se také přirozeně vyskytuje v surovém a zpracovaném ovoci a kvašených nápojích [29]. FMN je syntetizován v organismech enzymem *riboflavokinázou* nebo *riboflavinfosfotransferázou*. FAD vzniká z FMN adenylací účinkem *FMN-adenyltransferázy*. Flavínové enzymy jsou akceptory vodíkových atomů z redukovaných pyridinových koenzymů.

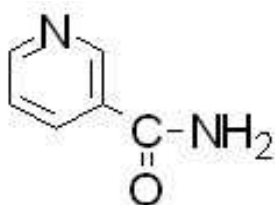
Vitamín B₂ se nachází jak v rostlinných, tak i živočišných organismech. Mezi bohaté zdroje tohoto vitamínu patří játra, ledviny a srdce, mléko a mléčné výrobky, kvasnice, obiloviny a některé druhy zeleniny (špenát, brokolice). Odhaduje se, že asi 40 % vitamínu získaného potravou zajišťuje mléko a výrobky z něj, asi 20 % maso a 15 % cereálie. Riboflavin je daleko lépe absorbován z potravin živočišného původu, než z rostlinné stravy [22].

Nedostatečný příjem riboflavinu se u člověka projevuje zánětlivými změnami kůže a sliznic, některými očními nebo nervovými poruchami [30]. Hypovitaminóza může být způsobena stresem, nemocemi štítné žlázy nebo záněty tenkého střeva.

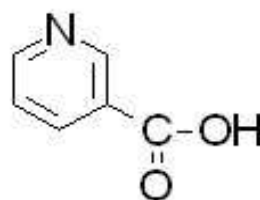
Výše doporučeného denního příjmu vitamínu B₁ je vzhledem k jeho působení v energetickém metabolismu a metabolismu proteinů závislá na obsahu proteinů a energetické hodnotě potravy. Doporučená denní dávka pro průměrného obyvatele ČR je 1,5 mg.den⁻¹ [22].

3.3 Vitamín B₃ – kyselina nikotinová a její amid

Původně byla nazývána vitamínem PP, později se užíval název niacin. V současné literatuře se označení niacin používá pro celou skupinu příbuzných látek tvořenou kyselinou nikotinovou, jejím amidem a jejich deriváty [21].



nikotinamid



kyselina nikotinová

Z kyseliny nikotinové vznikají dva koenzymy, které hrají důležitou roli v biochemických systémech. Jedná se o nikotinamidadeninukleotid (NAD^+ , NADH) a nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP^+ , NADPH), společně označované jako koenzymy *pyridinových dehydrogenáz* [22]. NAD^+ a NADP^+ se podílejí na syntéze a odbourávání cukrů, mastných kyselin i aminokyselin. Nejdůležitější *dehydrogenázy*, ve kterých působí NAD^+ a NADP^+ jako koenzymy, jsou *alkoholdehydrogenáza*, *laktátdehydrogenáza*, *malátdehydrogenáza* aj. [21].

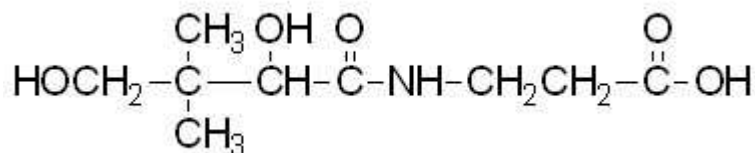
V rostlinách převažuje volná kyselina, v živočišných tkáních její amid. Jejich nejbohatším zdrojem jsou kvasnice, z výživového hlediska maso a vnitřnosti. Obiloviny jsou rovněž bohaté na kyselinu nikotinovou. Velmi málo je tohoto vitamínu v ovoci a zelenině.

Potřeba vitamínu B₃ je ovlivněna přísunem proteinů ve stravě. V našich podmínkách je hypovitaminóza z nedostatku vitamínu B₃ vzácná [22]. Strava s nedostatkem niacinu (stejně jako tryptofanu), vede k zánětům na jazyku, dermatitidě, hubnutí, průjmům, depresím a demenci. Těžké příznaky jako, deprese, dermatitida a průjmová onemocnění, jsou spojeny s onemocněním, známým jako pelagra [27]. Vysoké dávkování niacinu může zvýšit hladinu krevního cukru a zhoršit tak *diabetes mellitus* [31].

Při stanovení doporučeného příjmu tohoto vitamínu je nutno uvážit kromě příjmu z potravy, i ten, který byl vytvořen v játrech a ledvinách z tryptofanu. Doporučená výživová dávka v ČR pro obyvatele činí 16 – 20 $\text{mg}\cdot\text{den}^{-1}$ [22].

3.4 Vitamín B₅ – kyselina pantotenová

V přírodě se nejčastěji vyskytuje jako přirozená součást koenzymu A (CoA neboli CoA-SH) [22].



kyselina pantotenová

Tento vitamín je u lidí a zvířat esenciálním faktorem pro růst, reprodukci a normální fyziologické funkce. Jako součást koenzymu A se podílí na metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů. Speciální funkci má tato kyselina při syntéze a degradaci tuků, protože koenzym A přenáší dvojuhlikaté zbytky (acetyl-CoA) a aktivuje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem [21]. Kyselina pantotenová se v biochemických systémech vyskytuje i v další formě, a to vázaná v nosném proteinu ACP-SH (ACP, Acyl Carrier Protein), který hraje důležitou roli při biosyntéze mastných kyselin.

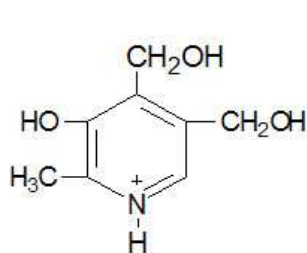
Kyselina pantotenová se vyskytuje téměř ve všech potravinách živočišného i rostlinného původu, ale ve velmi nízkých koncentracích. Můžeme ji najít ve vaječném žloutku, ledvinách, játrech, rybím mase, obilných zrnech, sýrech, luštěninách, rýži, houbách a kvasnicích [22].

Nedostatek kyseliny pantotenové je velmi vzácný. Příznaky deficitu je obtížné posoudit, protože připomínají příznaky nedostatku ostatních B vitamínů [27].

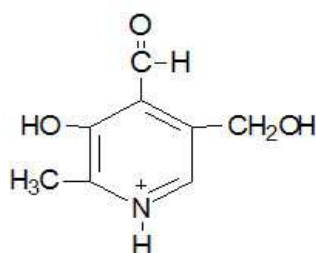
Mezinárodně doporučené dávky, které byly stanoveny na základě nutričních studií, se pohybují v rozmezí 3 až 14 mg.den⁻¹. Výživová doporučená dávka pro obyvatele ČR byla vypočtena na 7,3 mg.den⁻¹ [22].

3.5 Vitamín B₆ – pyridoxin

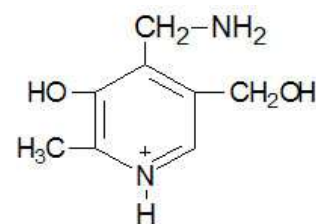
Pojmem pyridoxin se označují tři fyziologicky účinné vitamíny B₆, tzv. pyridoxinová triáda, tvořená pyridoxolem, pyridoxalem a pyridoxaminem [21].



pyridoxol



pyridoxal



pyridoxamin

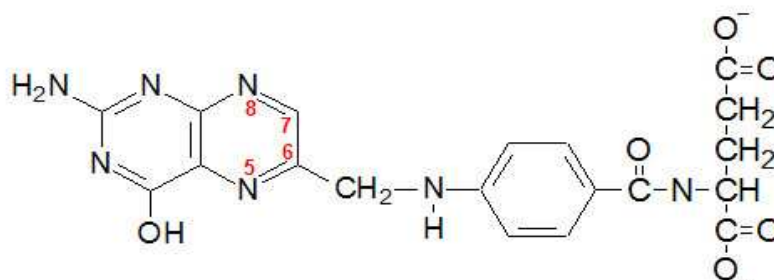
Každá z těchto látek může být použita snadno savci po přeměně v játrech na pyridoxalfosfát, což je aktivní forma vitamínu [32]. Pyridoxalfosfát se jako kofaktor *dekarboxyláz* účastní reakcí v metabolismu aminokyselin. Z reakcí se jedná hlavně o transaminaci, dekarboxylaci a racemizaci [22].

Ve vyšším množství se nachází v droždí, ve zvířecích vnitřnostech, ve vepřovém, drůbežím a rybím mase, dále pak v pšeničných klíčcích, cereáliích, celozrnných produktech a v sojových bobech [21].

Nedostatek vitamínu B₆ je vzácný. Projevuje se zvýšenou nervosvalovou dráždivostí (cukání víček, u dětí až křeče), zapomnětlivostí, záněty sliznice dutiny ústní [33]. Avitaminóza vitamínu B₆ je vzácná, v posledních letech se diskutuje o vztahu nedostatku pyridoxinu a kardiovaskulárním onemocnění. Vitamín B₆ hraje důležitou roli v metabolismu homocysteinu, jehož zvýšená hladina v plazmě je považována za nezávislý faktor vzniku a rozvoje kardiovaskulárních chorob.

Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR je 1,7 mg.den⁻¹. Jeho denní dávka se zvyšuje, jestliže stoupá příjem proteinů [22].

3.6 Vitamín B₉ – kyselina listová



kyselina listová

Kyseliny listové v redukované formě jako tetrahydrofoláty (TH₄) jsou významnými kofaktory *transferáz* přenášejících jednouhlíkaté zbytky (metylové –CH₃, metylenové –CH₂, formylové –CHO) [22]. Vitamín B₉ je v lidském organismu nezbytný pro syntézu purinů, pyrimidinů, regeneraci metioninu, ovlivňuje syntézu histidinu, cholinu a serinu. Hlavním místem biologického působení jsou játra. Nedostatečný příjem folátů zpomaluje tvorbu DNA a dělení buněk, a tak zasahuje rychle se dělící tkáň, jako je kostní dřev – výsledkem je anémie [21].

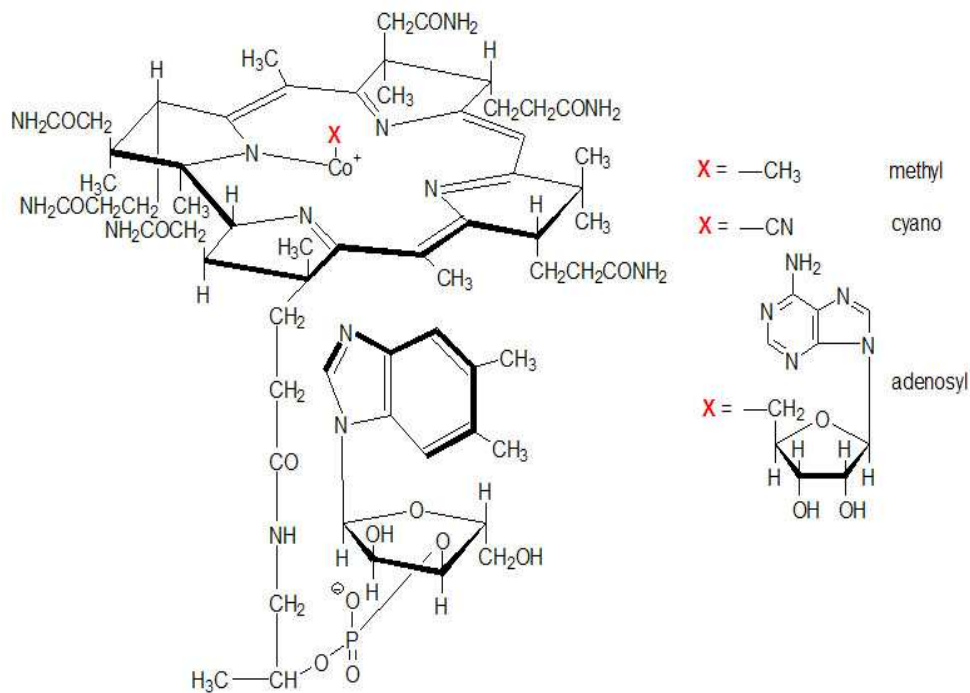
Kyselina listová se v přírodě vyskytuje zejména v zelených částech rostlin (špenát, salát, chřest). Dobrým zdrojem jsou i kvasnice. Z živočišných tkání je kyselina listová bohatě obsažena v játrech [23].

Vzhledem k relativně nízkému obsahu kyseliny listové v běžné smíšené stravě a značným ztrátám v průběhu kulinárních úprav potravin, může její deficit vnikat relativně často. Mohou se projevit příznaky jako např. poruchy růstu, záněty v dutině ústní, poruchy zažívacího traktu, celková slabost a únava [21]. Avitaminóza vede k projevům poruchy krvetvorby. Je věnována pozornost roli folátů ve vztahu ke kardiovaskulárnímu onemocnění a k rakovině. Bylo zjištěno, že nedostatek tohoto vitamínu vede k hyperhomocysteinemii. Dostatečný příjem kyseliny listové (vyšší než 400 μg.den⁻¹) je nutné zajistit i v době těhotenství, aby se maximálně snížilo riziko poškození neurální trubice u novorozenců.

V ČR činí doporučená denní dávka kyseliny listové pro osoby v produktivním věku 200 μg.den⁻¹. Zvýšený příjem až na 800 μg.den⁻¹ je doporučen pro těhotné a kojící ženy [22].

3.7 Vitamín B₁₂ – kyanokobalamin

Vitamín B₁₂ patří do skupiny látek zvaných korinoidy. Řadí se sem všechny látky odvozené od korinu, jehož skelet je příbuzný porfyrinu a v němž je komplexně vázán kobalt. U kyanokobalaminu je na kobaltu v korinovém kruhu vázána kyanidová skupina (CN⁻). Korinový kruh tvoří 4 pyrrolová jádra. Kromě korinového kruhu je v molekule vitamínu B₁₂ vázána ještě nukleotidová složka s 5,6-dimetyl-benzimidazolem jako bází [22].



struktura korinoidů

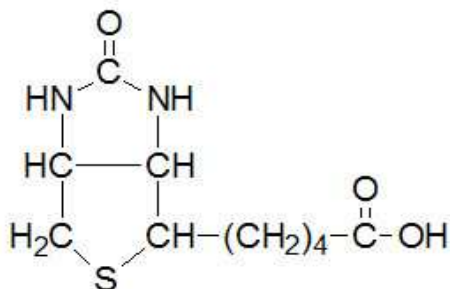
V přirozeném materiálu se vyskytuje vitamín B₁₂ převážně ve formě koenzymu nazývaného kobamidový koenzym [23]. Vstřebaný vitamín B₁₂ se v metabolických procesech mění na své aktivní formy, koenzymy adenosylkobalamin a metylkobalamin. Adenosylkobalamin je zodpovědný za intramolekulární přeskupování alkylových skupin při degradaci mastných kyselin a aminokyselin. Methylkobalamin hraje důležitou roli v transmetylačních procesech při syntéze metioninu a homocysteinu [21].

Vitamín B₁₂ byl nalezen pouze v mikroorganismech a potravinách živočišného původu. Nejbohatším zdrojem tohoto vitamínu jsou játra a ledviny, maso, mléko, vejce a sýry. Rostlinná strava obsahuje jen stopové množství kyanokobalaminu v případě, že byla zpracována bakteriální fermentací (kysané zelí).

Avitaminóza B₁₂ se projeví poruchou tvorby buněk v kostní dřeni nazývanou megaloblastická (perniciózní) anémie, tzv. zhoubná chudokrevnost, která se projevuje bledostí kůže a sliznic, únavou, nedostatečnou pohyblivostí a závratí. Klasicky se projevuje drastickým snížením hemu.

Doporučená dávka vitamínu B₁₂ se pohybuje v rozmezí 2,4 až 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$ [22].

3.8 Biotin



biotin

Biotin se vyskytuje jako prostetická skupina mnoha enzymů katalyzujících přenos oxidu uhličitého. Nejčastěji je vázán na protein přes ϵ -aminoskupinu lyzinu. Hydrolýzou tohoto proteinu se získá biocytin, který je považován za aktivní formu biotinu [22]. Po stránce biochemické se biotin uplatňuje jako koenzym značného počtu enzymů účastnících se karboxylačních reakcí [21].

V potravinách se biotin nachází buď ve volné formě nebo vázaný na bílkoviny. Velmi zajímavá je vazba biotinu na avidinovou frakci vaječného bílku, a to v poměru 3 molekuly biotinu na 1 molekulu avidinu. Tato vazba je velmi pevná a takto vázaný biotin je nevyužitelný, pokud není avidin denaturován varem [21]. Bohatým zdrojem biotinu jsou vaječné žloutky, játra, ledviny, kvasnice a rajčata.

Denní potřeba je běžně kryta vitamínem z potravy a vitamínem vznikajícím činností vlastní střevní mikroflóry. U člověka v podstatě nedochází k avitaminóze nebo hypovitaminóze. Nedostatek biotinu se projeví slabostí, anorexií, nauzeou, mentální retardací a kožními vyrážkami.

Doporučený denní příjem biotinu pro dospělého osobu se pohybuje v rozmezí 30 až 100 $\mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$ [22].

4 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

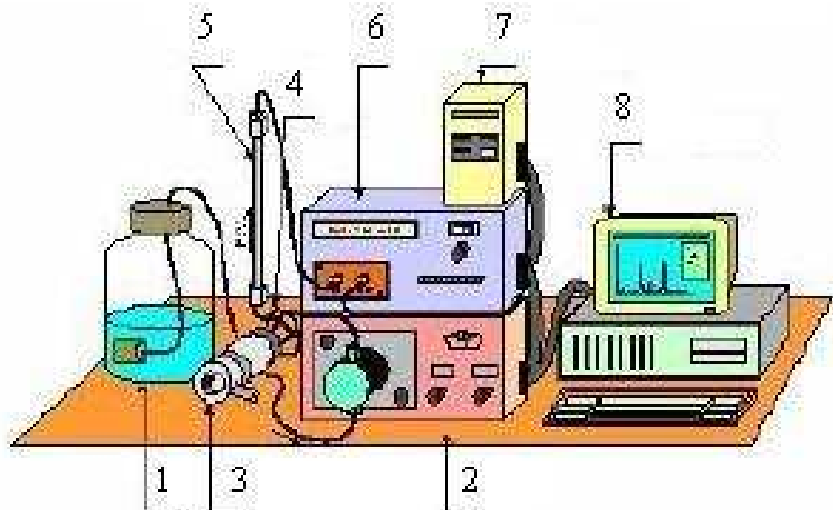
Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) byla vyvinuta v polovině 70. let.

V posledních deseti letech byl zaznamenán obrovský pokrok v rozvoji mikrokolon a dalších speciálních kolon. Rozměry typické HPLC kolony jsou 50 – 250 mm s vnitřním průměrem mezi 3 – 5 mm. Obvyklý průměr mikrokolony nebo kapilární kolony se pohybuje v rozmezí od 3 do 200 μm [34].

HPLC využívá kapalnou mobilní fázi pro oddělení složek ze směsi. Tyto komponenty se nejprve rozpustí v rozpouštědle a pak proudí přes chromatografickou kolonu pod vysokým tlakem. V koloně je směs rozdělena na své složky. Stacionární fáze je definována jako nepohyblivý obalový materiál v koloně [35]. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýza, se nazývá kapalinový chromatograf. Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram.

Kapalinový chromatograf je složen z těchto hlavních částí:

- zásobník s mobilní fází
- čerpadlo
- dávkovací ventil
- kolona
- detektor
- vyhodnocovací zařízení [36]



Obr. 2. Schéma kapalinového chromatografu (1 – zásobník s mobilní fází, 2 – čerpadlo, 3 – dávkovací ventil, 4 – smyčka, 5 – kolona, 6 – detektor, 7 – rozhraní, 8 – vyhodnocovací zařízení)

Metoda HPLC existuje jako tzv. „normální“ a „reverzní“.

- Normální HPLC – stacionární fáze má silně polární charakter (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (jako n-hexan nebo tetrahydrofuran).
- Reverzní HPLC – stacionární fáze je nepolární (hydrofobní), zatímco mobilní fáze je polární kapalina, jako například směs vody a metanolu nebo acetonitrilu [35].

Reverzní HPLC bývá označována jako RP-HPLC (Reverse Phase HPLC) a je nejčastěji užívanou formou HPLC [36].

4.1 Popis jednotlivých částí kapalinového chromatografu

4.1.1 Zásobník s mobilní fází

Mobilní fáze (zpravidla směsi organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů) se před použitím filtrují (odstranění nečistot) a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji ze skleněných lahví [37]. Mobilní fáze zde

vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (kvalitu separace) [36].

Přesto, že existuje celá řada rozpouštědel používaných v HPLC, mají několik společných vlastností: čistota, rozpustnost ve vzorku, nízká viskozita, chemická netečnost, rozumná cena.

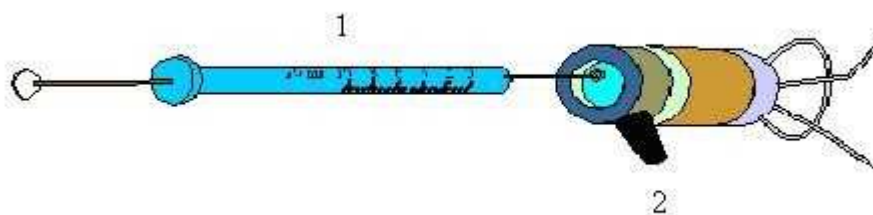
4.1.2 Čerpadlo

Kapalina se do kolony čerpá pístovými čerpadly. Dobré čerpadlo dosahuje průtoku od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu při tlaku až 60 MPa. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky [38].

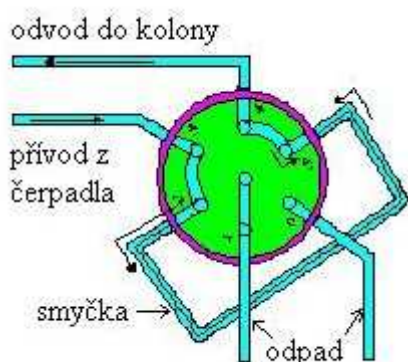
Pístová čerpadla fungují na následujícím principu. Vzniklým podtlakem dojde k nasátí určitého objemu kapaliny do pracovního prostoru čerpadla (uzavřeného), pohybem pístu dojde k natlakování tohoto objemu kapaliny a následuje vytlačení natlakované kapaliny mimo čerpadlo [39].

4.1.3 Dávkovací ventil

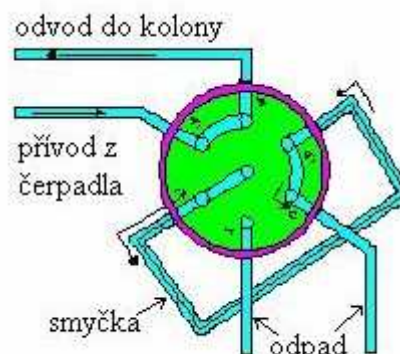
Dávkovací ventily pro kapalinový chromatografický systém by měly poskytnout možnost nástřiku kapalných vzorků v rozmezí od 0,1 do 100 μl objemu s vysokou opakovatelností a pod vysokým tlakem (60 až 80 MPa) [35].



Obr. 3. Dávkovací ventil (1 – injekční stříkačka, 2 – ventil)



Obr. 4. Ventil se smyčkou při plnění



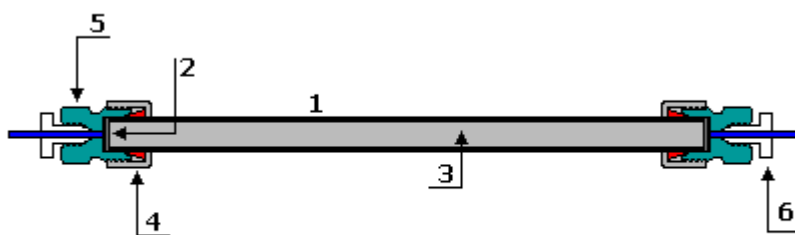
Obr. 5. Ventil se smyčkou naplněný

4.1.4 Kolona

Kolony používáme náplňové [38]. Chromatografická kolona je v podstatě trubka nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fází, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky: musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům, vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký.

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel (typ 316), plasty (PEEK, Polyéteréterketon) nebo sklo [40]. Běžný průtok eluátu je $1 - 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Používají se kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru $3 - 10 \mu\text{m}$ [38].

Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matrici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na niž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. RP HPLC používá chemicky vázanou nepolární stacionární fází. Nejpoužívanější je typ C_{18} , kde jsou molekuly octadecylsilanu vázány na částicích silikagelu. Mobilní fáze v systému RP je polární [37].



Obr. 6. Schéma HPLC kolony (1 – kovový plášť, 2 – porézní kovová frit, 3 – stacionární fáze, 4 – ochranný proužek, 5 – koncová hlavice, 6 – vstup pro kapiláru se šroubem)

4.1.5 Detektory

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluát. Zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku.

V současné době lze detektory rozdělit do dvou skupin:

- selektivní – jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluátu
- univerzální – jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponentě

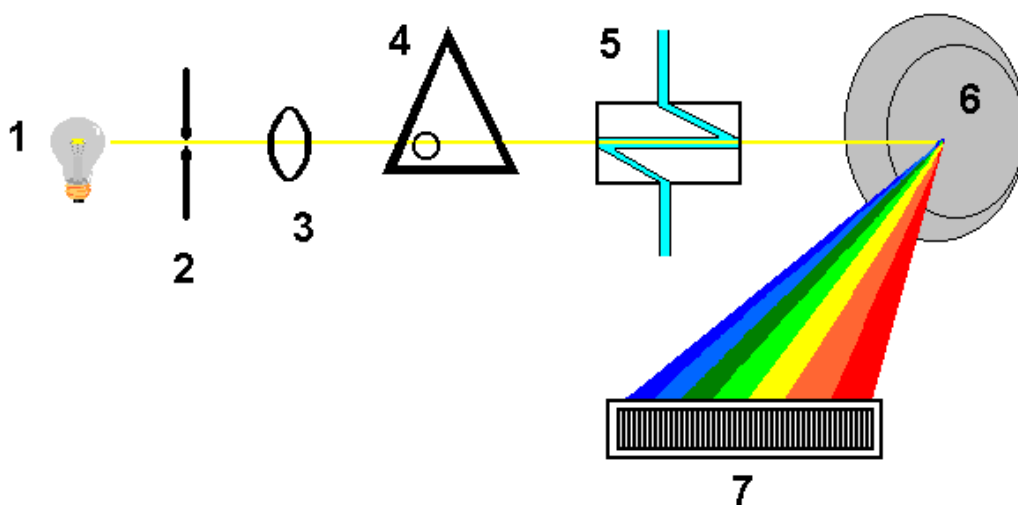
Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky: možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost), odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah), vysoká citlivost a nízká úroveň šumu.

4.1.5.1 Fotometrické detektory

Fotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti různých vlnových délek.

Podle konstrukčního typu se detektory mohou např. rozdělit:

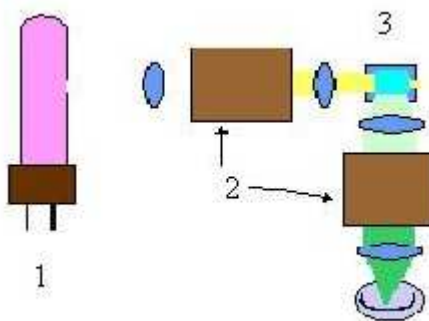
- detektory s programovatelnou vlnovou délkou; vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy
- detektory diodového pole (Photodiode–Array, PDA, DAD) snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce [40]



Obr. 7. Schéma detektoru s diodovým polem (1 – zdroj, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná clona detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 – zářivý tok o určité vlnové délce)

4.1.5.2 Fluorescenční detektory

Jsou založeny na principu fluorescence, což je schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce [38]. Fluorescenční intenzita závisí na excitační a emisní vlnové délce, což umožňuje selektivně detekovat některé složky [35].



Obr. 8. Schéma fluorescenčního detektoru (1 – xenonová lampa, 2 – monochromátory, 3 – tok buňkou)

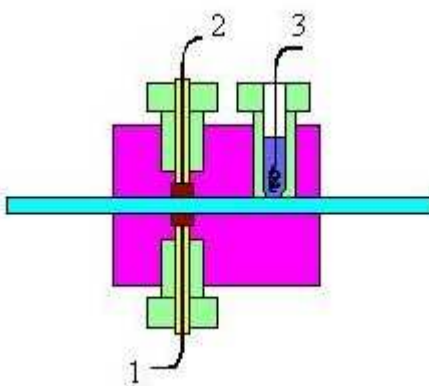
4.1.5.3 Refraktometrický detektor

Detekční princip spočívá v měření změny indexu lomu eluátu a čisté mobilní fáze [35]. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka. Při jeho použití je nutné přísně dodržovat konstantní teplotu [38].

4.1.5.4 Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda – roztok (mobilní fáze). Použití elektrochemických detektorů není příliš velké, ale detekují se jimi látky, jako např. léčiva a přírodní produkty.

Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud, kapacita) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce a to v systému dvouelektrodotového nebo tříelektrodotového zapojení (elektrochemický článek).

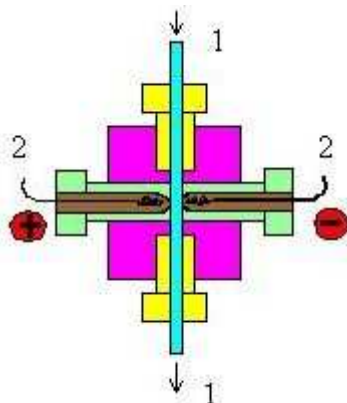


Obr. 9. Schéma elektrochemického detektoru (1 – opačná elektroda, 2 – pracovní elektroda, 3 – referenční elektroda)

4.1.5.5 Vodivostní detektor

Vodivostní detektory patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. U tohoto typu detektoru jsou kladeny vysoké požadavky na mobilní fázi, která by měla být pokud možno nevodivá, musí však dostatečně rozpouštět chromatografované látky a mít dostatečně velkou permitivitu. Tyto podmínky splňuje redestilovaná voda, popřípadě i s příměsí polárních organických rozpouštědel. Její nepatrná vodivost pak umožňuje detekci i stopových složek iontů vycházející z kolony.

Vodivostní detektory nacházejí své uplatnění nejvíce v iontové chromatografii, kdy se používá kolon plněných ionexy s nízkou kapacitou [40].



Obr. 10. Schéma vodivostního detektoru (1 – tok mobilní fáze, 2 – elektrody)

4.1.5.6 Hmotnostní detektor

Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon [37].

4.2 Popis HPLC analýzy

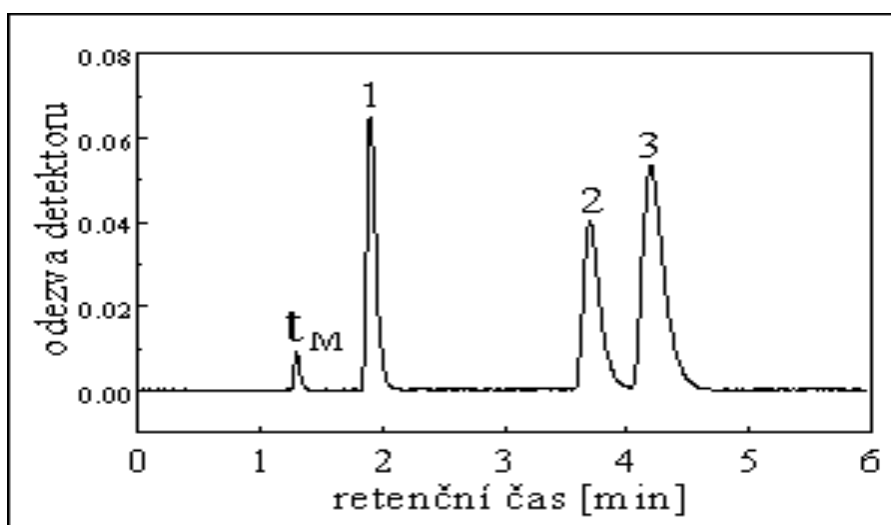
Aparaturou protéká mobilní fáze, která je vedena ze zásobních lahví přes vysokotlakou pumpu (čerpadlo) do kolony, z té do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k oddělování jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván ve vyhodnocovacím zařízení (PC) a tisknut v podobě chromatogramu, jež je výsledkem HPLC analýzy.

Chromatogram je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, jsou od sebe různě vzdálené a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.

Pokud je zkoumaná směs dobře rozdělena, pak každý pík na chromatogramu odpovídá jedné ze složek směsi. Poloha píku na ose x, která je uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu) určuje o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza). Identifikace píků (látek) se

provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede analýza předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, tzv. standardní směs. Pokud jsou retenční časy píků na chromatogramu neznámé směsi shodné s retenčními časy píků směsi o známém složení, jedná o stejné látky. Koncentrace látek ve směsi se určuje z ploch nebo výšek píků metodou kalibrace.

Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny a jiné), které by při použití jiné metody byly znehodnoceny [36].



Obr. 11. Chromatogram

5 MOŽNOSTI STANOVENÍ VITAMÍNŮ SKUPINY B METODOU HPLC

V následující části jsou vybrány různé možnosti stanovení vitamínů skupiny B, které by bylo možno modifikovat a poté aplikovat na vzorky sýrů.

5.1 HPLC analýza nikotinamidu, pyridoxinu, riboflavinu a thiaminu v některých vybraných potravinách

5.1.1 Použité suroviny

K analýze byly vzaty suroviny produkované v Nigérii, jednou z nich byly i mléčné produkty, které byly zakoupeny v místní obchodní síti.

5.1.2 Příprava vzorků

Potraviny v pevném stavu byly naváženy (50 g vzorku) do odměrné baňky. Následně bylo přidáno 1000 ml pufru obsahujícího sodnou sůl kyseliny hexasulfonové, deionizovanou vodu a ledovou kyselinu octovou. Kapalné vzorky byly připraveny pipetováním 25 ml vzorku a doplněním pufru na objem 1000 ml. Takto připravené vzorky byly před dávkováním filtrovány přes Millipore filtr (0,22 μm).

5.1.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů

Analýza byla provedena použitím Varian HPLC s ručním vstřikováním. Systém byl tvořen čerpadlem Varian 9012, UV/VIS detektorem Varian 9050 a počítačem Dell.

Chromatografická separace a analýza vitamínů byla provedena použitím kolony s reverzní fází Nova-Pack C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 μm) při laboratorní teplotě. Mobilní fáze byla složena ze 70 % pufru (roztok sodné soli hexasulfonové kyseliny) a 30 % metanolu. Analýza byla provedena v izokratickém režimu při průtoku 1 ml.min⁻¹. Odtok z kolony byl monitorován při vlnové délce 254 nm [41].

5.2 Stanovení změn množství riboflavinu v mléce a nemléčných imitacích mléka při skladování v chladu pomocí HPLC

5.2.1 Použité suroviny

Vzorky použité při práci byly nakoupeny v obchodech. Jednalo se o tři UHT balení zpracovaného kravského mléka. Po otevření obalů byly vzorky skladovány v ledničce při teplotě $8\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ po dobu 6 dní.

5.2.2 Příprava vzorků

Byl připraven 10% (w/v) roztok octanu olovnatého (pH 3,2) použitím ledové kyseliny octové. 2,5 ml připraveného roztoku bylo přidáno do 25 ml mléka, vše bylo velmi dobře zamícháno a filtrováno přes filtrační papír č. 42 Whatman. Poté bylo odebráno 10 ml filtrátu a tento filtrát byl zfiltrován znovu, ale nyní přes Millipore HVLP 04700 filtr (0,45 μm). V průběhu přípravy byly vzorky chráněny před světlem. Nádoby a baňky byly zakryty hliníkovou folií a manipulace s nimi byla prováděna za tlumeného světla. Vzorky odebrané při zkoušce byly skladovány za hlubokého zmrazení a všechny byly analyzovány ve stejný den.

Tento pracovní postup by mohl být modifikován tak, že by se vzorky sýrů důkladně zhomogenizovaly v octanovém pufru.

5.2.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu

Pro HPLC analýzu byl použit chromatograf vybavený datovým modulem Model 730 a kontrolním systémem Model 721, dvěma čerpadly Model 510 a spektrofotometrem Model 481 LC a smyčkou 10 μl .

Pro chromatografické stanovení byla použita kolona Spherisorb ODS 2 (150 x 3,9 mm; 5 μm) s ochrannou kolonou Bondapak C₁₈. Rozpouštěcím systémem byla voda – kyselina octová, metanol (70 : 30 v/v) / kyselina octová (1,5 ml v 1 l vody). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml.min⁻¹. Detekce byla provedena při vlnové délce 270 nm [42].

5.3 Stanovení kyseliny pantotenové v kojenecké výživě vysoce účinnou kapalinovou chromatografií

5.3.1 Použité suroviny

K analýze byla použita kojenecká výživa vyrobená z kravského mléka přizpůsobená mléku lidskému, která slouží jako umělá výživa pro kojence, kteří nemohou být kojeni mateřským mlékem.

5.3.2 Příprava vzorků

Bylo smícháno a zhomogenizováno 15 g kojenecké výživy v prášku se 100 ml vody o teplotě 40 °C a vzorek byl protřepán. Poté byl zchlazen na 20 °C. K 5 ml zhomogenizované směsi byl přidán roztok kyseliny octové (0,5 ml, 10%, v/v) a octan sodný (0,5 ml, 1 mol.dm⁻³). Směs byla nechána 5 minut odstát a následně byla dána do centrifugy při 1500 x g na 10 minut z důvodu odstranění bílkovin a tuků. Kalná část byla filtrována přes 0,45 µm filtr (Millipore).

Tento postup by byl vhodný pro stanovení vitamínů B v sýrech. Vzorek sýru by se důkladně zhomogenizoval s roztokem kyseliny octové a octanem sodným.

5.3.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu

Systém HPLC byl složen z dvoupístového čerpadla (model 510) a automatického sampleru vzorků (model 717). Do HPLC systému bylo dávkováno 20 µl. Jako mobilní fáze byl použit 0,25 mol.dm⁻³ fosforečnan sodný – acetonitril (97 : 3, v/v) o pH 2,5. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Pro separaci kyseliny pantotenové ze vzorku byla použita kolona s reverzní fází Superesphere C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm). Jako detekce byl použit diodový detektor (model 996) a měření bylo provedeno při vlnové délce 197 nm [43].

5.4 Stanovení ve vodě rozpustných vitamínů v kojenecké výživě vysoce účinnou kapalinovou chromatografií

5.4.1 Použité a suroviny

Jako vzorek pro stanovení byla použita tekutá kojenecká výživa a kojenecká výživa v prášku.

5.4.2 Příprava vzorku

Tekutá kojenecká výživa: 10,5 g přesně naváženého vzorku bylo dáno do 50 ml nádoby centrifugy (30 mm průměr). Byl přidán 1 g pevné kyseliny trichloroctové a magnetické míchadlo. Míchání bylo provedeno na magnetickém míchacím zařízení a byly separovány 2 fáze na centrifuze po dobu 10 minut při 1250 x g. K pevné získané usazenině byly přidány 3 ml 4% kyseliny trichloroctové a vzorek byl odstředován 10 minut na centrifuze. Pevná fáze byla odstraněna. Získané kyselé extrakty byly smíchány v 10 ml odměrné baňce a objem byl doplněn 4% kyselinou trichloroctovou. Před HPLC analýzou byly kyselé extrakty přefiltrovány přes 0,45 µm filtr. Vzorky byly chráněny proti světlu hliníkovou folií a práce byla provedena při tlumeném osvětlení.

Prášková kojenecká výživa: bylo naváženo přesně 8,0 g a přidáno 10 ml destilované vody. Další postup byl proveden jako u tekuté kojenecké výživy.

Tento pracovní postup by mohl být využit ke stanovení ve vodě rozpustných vitamínů, tak že by se vzorky sýrů důkladně zhomogenizovaly v kyselině trichloroctové.

5.4.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů

HPLC systém (Hewlett-Packard, CA, USA) byl složen z HP 1050 kontrolního systému čerpadla, HP 1050 odplyňovacího systému, HP 1100 automatického vzorkovače s 10 µl smyčkou a z HP 1050 UV detektoru. Záznam dat byl uskutečněn pomocí Chemstation systému HP 3365–II.

Mobilní fáze byla složena z 5 mmol.dm⁻³ kyseliny oktasulfonové, 0,5 % triethylaminu, 2,4 % ledové kyseliny octové a 15 % metanolu. pH roztoku bylo upraveno na 3,6 ± 0,1 použitím kyseliny octové nebo triethylaminu. Před vstříknutím do HPLC byl roztok přefiltrován přes 0,45 µm filtr. Separace vitamínů byla provedena na koloně Tracer

Spherisorb ODS 2 C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm). Analýza byla provedena izokraticky při laboratorní teplotě při průtoku 1 ml.min⁻¹. Detekce byla provedena na UV detektoru. Vlnová délka, při které bylo stanovení provedeno, nebyla uvedena [44].

5.5 Stanovení riboflavinu a vitamínu B₆ v mléce a farmaceutických preparátech kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí

5.5.1 Použité suroviny

K analýze bylo použito obchodní mléko obohacené vitamíny a mléko ženské.

5.5.2 Příprava vzorku

K 5 ml mléčného vzorku ve zkušební trubici bylo přidáno 0,5 ml 1 mol.dm⁻³ kyseliny trifluoroctové. Vzorek byl důkladně zamíchán a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po hydrolyze byla směs odstředěna v centrifuze po dobu 15 minut při otáčkách 3000 x g. Dvě střední části (bílkoviny na dně zkušební trubice a tuk na vrchu trubice) byly smíchány v 5 ml odměrné baňce a objem byl doplněn deionizovanou vodou. Připravený roztok byl filtrován přes 0,45 μm nylonový filtr. Následně byl 1 ml roztoku zředěn na 5 ml s mobilní fází.

Kondicionování vzorků bylo provedeno v souladu s jejich povahou a složením, vyvarováním se vystavení působení světla použitím jantarově zbarvených baněk nebo zakrytím baněk hliníkovou folií.

Tento způsob přípravy vzorku by mohl být použit i pro přípravu vzorků sýrů. Vzorek sýra by se důkladně zhomogenizoval v kyselině trifluoroctové.

5.5.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů

Kapalinový chromatograf byl složen z Jasco modelu LG-980-02S třídílné gradientní jednotky, pumpy (Jasco PU-1580) a fluorometrického detektoru Jasco FP-920 s programovatelnou vlnovou délkou připojeného k PC AcerView 34TI. Byl použit integrační program Borwin. Roztoky byly odplyňovány odplyňovacím modelem Gastorr 153 S.A.S. Corporation. Manuální vstřikování bylo prováděno na dávkovači Rheodyne model 7125 se smyčkou 20 μl. Byl použit kolonový vstupní filtr (0,5 μm x 3 mm) model

7335 Rheodyne. Emisní spektra byla zaznamenávána zapisovačem Jasco FP-920 pomocí fluorometrického detektoru, který byl spojen s kapalinovým chromatografem použitím spektrálního měření v programovatelném režimu. Eluát byl ozařován v kapiláře PTFE (20 m x 0,3 mm) pomocí 8 W nízkotlaké rtuťové lampy s hlavní spektrální emisí 254 nm.

Separace byla provedena při $32 \pm 2^\circ\text{C}$ na koloně Phenomenex Lina C₈ (250 x 3,0 mm; 5 μm) s ochrannou kolonou. Použita byla mobilní fáze složená ze směsi A : B, kde A byl 10 mmol.dm⁻³ pentasulfonát sodný v 1% (v/v) kyselině octové a B byl metanol/tetrahydrofuran 98:2 (v/v), při průtoku 0,4 ml.min⁻¹ a za izokratických podmínek. Byla použita fluorescenční detekce. Emisní vlnová délka byla použita v rozpětí 400 – 524 nm a excitační vlnová délka v rozpětí 295 – 370 nm [32].

5.6 Extrakční postup pro HPLC stanovení thiaminu, riboflavinu a vitamínu B6 v potravinách

5.6.1 Použité suroviny

Ke stanovení byly použity kvasnice, sušené mléko, vepřový řízek, telecí řízek, filet z makrely, pšeničná mouka, ovesná kaše, rýže, hrášek, pomerančová šťáva a mrkev, které byly zakoupeny z místních zdrojů.

5.6.2 Příprava vzorku

5.6.2.1 Postup extrakce pro stanovení thiaminu a riboflavinu

a) 15 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl bylo přidáno ke vzorku v 250 ml kuželové baňce. Roztok byl umístěn do vodní lázně o teplotě 100 °C nebo do autoklávu o teplotě 121 °C na 30 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH na 4,5 pomocí 2,5 mol.dm⁻³ octanu sodného. Následně byla přidána *takadiastáza* nebo *claradiastáza* (500 mg). Roztok byl inkubován po dobu 18 hodin v termostatu při teplotě 37 °C, následně byl zředěn 100 ml destilované vody v baňce a přefiltrován přes filtrační papír. Filtrát, získaný po druhé filtraci byl použit pro chromatografické stanovení riboflavinu.

b) Stejný postup jako v a), ale bez přídavku *diastáz*.

c) 15 ml $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu sodného (pH 4,5) a 500 mg *takadiastázy* nebo *claradiastázy* bylo přidáno ke vzorku do 250 ml kuželové baňky. Dále bylo se vzorkem postupováno jako v případě a).

d) Stejný postup jako v c) ale bez přídavku *diastáz*.

e) Stejný postup jako v c), avšak *diastázy* byly nahrazeny směsí *papainu* (100 mg nebo méně), 1% glutationu (500 μl), kyselá *fosfatázy* (20 mg nebo méně) a α -*amylázy* (10 mg nebo méně).

f) Stejný postup jako v c), ale *diastázy* byly nahrazeny směsí *papainu* (100 mg), 1% glutationu (500 μl) a α -*amylázy* (10 mg).

5.6.2.2 Postup extrakce pro stanovení vitamínu B₆

a) 15 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl bylo přidáno ke vzorku do 250 ml kuželové baňky. Roztok byl umístěn do vodní lázně o teplotě 100 °C nebo do autoklávu o teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Po zchlazení se pH upraví na hodnotu 4,5 pomocí $2,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu sodného. Byla přidána $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyselina glyoxylová (2,5 ml), 2% roztok síranu železnatého (400 μl) a kyselá *fosfatáza* (20 mg). Roztok byl inkubován po dobu 18 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Vzorek byl následně zředěn 100 ml destilované vody v baňce a přefiltrován přes filtrační papír. Do 4,5 ml roztoku obsahujícího $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydroxid sodný a $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ borhydrid sodný bylo přidáno 5 ml filtrátu. Po protřepání byl roztok nechán 5 minut odstát. Poté bylo přidáno 0,5 ml ledové kyseliny octové a roztok byl přefiltrován.

b) K 2,5 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyseliny glyoxylové, 400 μl 2% roztoku síranu železnatého a 20 mg kyselá *fosfatázy* (nebo 500 mg *diastázy*) bylo přidáno 15 ml $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu sodného (pH 4,5), tento roztok byl přidán ke vzorku do kuželové baňky. Dále bylo se vzorkem postupováno jako v případě a).

c) Stejný postup jako v b), kyselá *fosfatáza* byla nahrazena směsí *papainu* (100 mg), 1% glutationu (500 μl), kyselá *fosfatázy* (20 mg nebo méně) a α -*amylázy* (10 mg).

d) Stejný postup jako v b), ale bez použití enzymů.

e) Stejný postup jako v b), ale kyselá *fosfatáza* byla nahrazena 20 mg β -*glukosidázy*.

f) Stejný postup jako v e), ale bylo přidáno 20 mg kyselé *fosfatázy* nebo 500 mg *takadiastázy* k β -*glukosidáze* [45].

5.6.3 Chromatografické podmínky stanovení

5.6.3.1 Chromatografické podmínky stanovení vitamínu B₁ a B₂

Separace byla provedena na koloně s reverzní fází (250 x 4 mm; 10 μ m) izokraticky s mobilní fází skládající se z metanolu a 0,05 mol.dm⁻³ octanu sodného (30 : 70 v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Jako detekce byl použit fluorometrický detektor. Excitační vlnová délka byla 422 nm a emisní vlnová délka 522 nm. Dávkované množství bylo 20 μ l [46].

5.6.3.2 Chromatografické podmínky stanovení vitamínu B₆

Pro analýzu byla použita kolona Lichrospher 60 RP Select B (250 x 5 mm; 5 μ m) a ochranná kolona RP 18 (4 x 4 mm; 10 μ m). Separace pomocí iontové chromatografie byla provedena izokraticky s mobilní fází skládající se z acetonitrilu / 0,05 mol.dm⁻³ dihydrogenfosforečnanu draselného (4 : 96 v/v) obsahujícího 0,5.10⁻³ mol.dm⁻³ heptasulfonátu sodného (nebo 0,3.10⁻³ mol.dm⁻³ oktasulfonátu sodného). Mobilní fáze byla upravena na pH 2,5 pomocí kyseliny ortofosforečné a následně byla přefiltrována přes acetcelulózový filtr (0,45 μ m). Stanovení bylo provedeno při laboratorní teplotě při průtoku 1 ml.min⁻¹. Fluorometrický detektor pracoval na excitačních vlnových délkách 290 nm a emisních vlnových délkách 396 nm. Dávkované množství bylo 20 μ l [47].

5.7 Chromatografické stanovení riboflavinu a jeho derivátů v jídle

5.7.1 Použité suroviny

Pro stanovení byly použity vajíčka, vaječný prášek, pasterované mléko, fermentované mléčné produkty (neochucený jogurt, kefír, kysané mléko, acidofilní mléko, podmáslí) a játra (telecí, kuřecí a vepřová).

5.7.2 Příprava vzorku

Mléko a fermentované mléčné produkty byly připraveny přímo z balení těsně před analýzou [48]. Vzorky (12 g) byly umístěny do extrakční trubice, suspendovány do 19 ml metanol-metylenchloridu (9 : 10, v/v) a vše bylo mícháno po dobu 60 sekund. Po přidání 9 ml $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ octanu amonného (pH 6,0) bylo vše opět mícháno po dobu 60 sekund a následně odstředěno při $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut a při $27\,000 \times g$. Všechny vzorky byly před dávkováním do HPLC kolony filtrovány přes $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filtr a po celou dobu byly chráněny proti působení světla [49].

5.7.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínu

HPLC separace byla prováděna na kapalinovém chromatografu model 600E (Waters, Milford, MA, USA) vybaveného analytickou kolonou Alhabond C_{18} (300 x 4,6 mm; $10 \text{ }\mu\text{m}$) nebo kolonou Symmetry C_{18} (150 x 3,9 mm; $5 \text{ }\mu\text{m}$) spolupracující s $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ nebo Nova-Pak C_{18} předkolonou. Pro identifikaci flavinů byly použity tři izolační metody:

- a) mobilní fáze: metanol – $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ octan amonný (pH 6,0) (Alhabond C_{18} kolona),
- b) mobilní fáze: metanol – demineralizovaná voda, (Alhabond C_{18} kolona),
- c) mobilní fáze: metanol – $0,05 \text{ mol.dm}^{-3}$ octan amonný (pH 6,0) (Symmetry C_{18} kolona).

Předběžná HPLC analýza flavinů byla provedena na koloně $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (100 x 25 mm; $10 \text{ }\mu\text{m}$) spolupracující s $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ předkolonou (10 x 25 mm; $10 \text{ }\mu\text{m}$), použitím metod A nebo B s průtokem 3 ml.min^{-1} .

Jako detekce byl použit skenovací fluorescenční detektor s duální monochromatickou konfigurací na emisní vlnové délky 530 nm s excitací na 450 nm pro isoalloxazinové deriváty a emisní vlnové délky 430 nm s excitací na 380 nm alloxazinové deriváty. Dodatečně byly použity foto–diodové detektory k odlišení flavinů od jiných směsí na základě jejich absorpčního spektra.

Koncentrace FAD, FMN a riboflavinu byly stanoveny s použitím jejich odpovídajících standardních křivek (metoda c) připravených za stejných chromatografických podmínek jaké byly použity pro stanovení flavinů v potravinách [48].

5.8 Fermentovaná mléka obohacená vitamíny skupiny B: stabilita vitamínů a vliv na vlastnosti výrobku

5.8.1 Použité suroviny

Jako surovina bylo použito pasterované a homogenizované obchodní plnotučné kravské mléko, které bylo obohaceno přísadkou vitamínů (thiamin, riboflavin, pyridoxin a kyselina listová). K výrobě fermentovaného mléka byly použity čtyři různé druhy kultur.

5.8.2 Příprava vzorků

K 20 g fermentovaného produktu byly přidány 2,2 ml 100% (w/v) kyseliny trichloroctové a vše bylo řádně zamícháno po dobu 30 minut (Vortex). Poté bylo provedeno při 10 000 x g po dobu 15 minut odstředování při teplotě 4 °C a roztok byl přefiltrován přes filtrační papír. K usazenině na filtračním papíru bylo přidáno 5 ml 5% (w/v) kyseliny trichloroctové a směs byla míchána po dobu 1 minuty (Vortex) a odstředěna při 10 000 x g po dobu 15 minut při 4 °C. Roztok byl přefiltrován přes stejný filtrační papír. Objem smíchaných filtrátů byl upraven na 22 ml a před analýzou filtrován přes 0,45 µm acetcelulózový filtr.

5.8.3 Vybavení a chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů

Pro separaci vitamínů byl použit HPLC systém LKB Bromma, vybavený kolonou Nucleosil C₁₈ (250 x 4 mm; 5 µm) kombinovaný s před-kolonou (4 x 8 mm) ze stejného materiálu. Izokratická eluce byla provedena použitím vodného roztoku obsahujícího 5 mmol.dm⁻³ sodné soli kyseliny oktasulfonové, 0,5 % (v/v) triethylaminu, 2,4 % (v/v) ledové kyseliny octové a 15 % (v/v) metanolu. Stanovení bylo provedeno při laboratorní teplotě a průtoku 0,8 ml.min⁻¹. Absorbance eluátu byla monitorována při vlnových délkách 261 nm a 290 nm pomocí UV/VIS detektoru spojeného se systémem pro zaznamenávání a zpracování dat [50].

ZÁVĚR

Vysoce účinná kapalinová chromatografie je separační metoda, při které jsou látky rozděleny mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tvořena fází pohyblivou (mobilní) a druhá fází nepohyblivou (stacionární). Zařízení, na kterém je provedena samotná separace se nazývá kapalinový chromatograf, výsledkem analýzy je chromatogram. V současné době je stále více využívána RP–HPLC, což znamená, že stacionární fáze je nepolární, zatímco mobilní fáze je polární.

Před provedením analýzy je potřeba nejprve stanovit složku ze vzorku izolovat. Izolace může být provedena např. kyselou nebo enzymatickou hydrolyzou. Pro možnost stanovení vitamínů B v sýrech, které byly vybrány do bakalářské práce, byly navrženy oba způsoby izolace. Pro kyselou hydrolyzu byl použit např. octan olovnatý (pH 3,2), octan sodný, kyselina trichloroctová nebo kyselina trifluoroctová. Enzymatická hydrolyza byla provedena použitím enzymů jako např. *takadistáza*, *claradistáza* (α -amyláza, celulóza, invertáza, peptidáza, fosfatáza a sulfatáza), α -amyláza, fosfatáza a papain. Jako pravděpodobnější se bude jevit asi enzymatická hydrolyza. Vzorek získaný po izolaci přichází do kontaktu s mobilní fází, která je používána jako nosič. Mobilní fáze použité pro stanovení byly složeny např.: ze 70 % roztoku sodné soli hexansulfonové kyseliny a 30 % metanolu; vody – kyseliny octové, metanolu (70 : 30 v/v) / kyseliny octové; 0,25 mol.dm⁻³ fosforečnanu sodného – acetonitrilu (97 : 3, v/v); 5 mmol.dm⁻³ kyseliny oktasulfonové, 0,5 % triethylaminu, 2,4 % ledové kyseliny octové a 15 % metanolu; směsi A : B, kde A byl 10 mmol.dm⁻³ pentasulfonát sodný v 1% (v/v) kyselině octové a B byl metanol/tetrahydrofuran 98:2 (v/v). Nedílnou součástí přístroje je kolona, kde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku. Nejpoužívanějšími kolonami byly kolony s reverzní fází C₈, C₁₈ (počty atomů uhlíku zakotvené na stacionární fázi, nejčastěji na bázi silikagelu) jako např. Nova–Pack C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m), Superesphere C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m), Tracer Spherisorb ODS 2 C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m), Phenomenex Lina C₈ (250 x 3,0 mm; 5 μ m), Nucleosil C₁₈ (250 x 4 mm; 5 μ m). Další částí, která následuje po koloně, je detektor. Nejčastěji byly použity UV/VIS a fluorimetrické detektory.

V naší biochemické laboratoři jsou k dispozici dva kapalinové chromatografy, které pracují s reverzní fází. Jeden z kapalinových chromatografů obsahuje UV/VIS detektor, druhý pracuje s elektrochemickou detekcí. Kolony, které lze využít v laboratoři k analýze, jsou

např. Ascentis™ C₁₈ (150 x 406 mm; 5 μm), Discovery® C₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm),
Supelcosil LC-8 (150 x 4,6 mm; 5 μm).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BŘEZINA, P., KOMÁR, A., HRABĚ, J. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin*, Vyškov, 2001, 177 s.
- [2] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka*, Praha, 1990, 166 s.
- [3] Dostupné na: <http://www.bezlepkovadieta.cz/?url=potraviny-zivocisneho-puvodu&clanek=1547> [online 11.11.2008]
- [4] NOVÁK, V., BUŇKA, F. *Základy ekonomiky výživy*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 219 s.
- [5] Dostupné na: <http://pribina.expo58.cz/49/vyziva-a-mlecne-vyrobky.html> [online 11.5.2008]
- [6] KADLEC, I., ŠULC, J. *Suroviny a materiály mlékárenského průmyslu pro 1. ročník SOU*, SNTL Praha, 1984, 96 s.
- [7] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003, 78 s.
- [8] KADLEC, P. a kolektiv, *Technologie potravin II*, Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, 2007, 236 s.
- [9] ŠEBELA, F., DUŠEK, B., PAVEL, J. *Mlékařství*, Státní zemědělské nakladatelství v Praze, 1964, 328 s.
- [10] KNĚŽ, V. , ČERNÁ, M. , SÁGA, P. , SUCHOMEL, J. , TORŠ, J. , TRENDÁ, O. , TVRDÍK, J. , *Mlékárenská příručka*, SNTL Praha, 1974, 448 s.
- [11] KNĚŽ, V. *Výroba sýrů*, SNTL Praha, 1960, 380 s.
- [12] Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu
- [13] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, 180 s.
- [14] Dostupné na: <http://old.mendelu.cz/~agro/af/chov/ovce/sbornik.doc>. [online 14.11.2008]

- [15] KOPÁČEK, J. Odpovědi na dvě aktuální otázky, *Potravinářský zpravodaj*, Vol. 9., No. 6, 2008, s. 17
- [16] Dostupné na: <http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/tab/95002F607F> [online 11.11.2008]
- [17] Mlékárenská technologie, dostupné na: www.cepac.cz, e-learningové materiály UTB ve Zlíně
- [18] KNĚŽ, V., PAČOVÁ, H. *Sýry a příprava sýrových jídel*, SNTL Praha, 1957, 130 s.
- [19] COMBS, G., F. *The vitamins*, Academic Press, 1992, 618 s.
- [20] FRAGNER, J. et al. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*, ČSAV Praha, 1961, 647 s.
- [21] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, Grada Publishing, a.s., 2400, 232 s.
- [22] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007, 104 s.
- [23] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*, SNTL Praha, 1981, 360 s.
- [24] LYNCH, P., L., M., YOUNG, I., S. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, Vol. 881 2000, p. 267 – 284
- [25] Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Thiamin> [online 27.2.2009]
- [26] LEONHARDT, M., WENK, C. Animal species and muscle related differences in thiamine and riboflavin contents of Swiss meat, *Food Chemistry*, Vol. 59, 1997, p. 449 – 452
- [27] Dostupné na: <http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html> [online 27.2.2009]
- [28] Dostupné na: http://www.pharmanews.sk/aktualni_cislo/site/clanek2.html [online 27.2.2009]
- [29] ANDRÉS-LACUEVA, C., MATTIVI, F., TONON, D. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavinadenine dinucleotide in wine and

- other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of chromatography A*, Vol. 823, 1998, p. 355 – 363
- [30] Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Riboflavin> [online 27.2.2009]
- [31] Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Niacin> [online 27.2.2009]
- [32] GATTI, R., GIOIA, M., G. Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B₆ vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals, *Analytica chimica acta*, Vol. 538, 2005, p. 135 – 141
- [33] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pyridoxin> [online 12.3.2009]
- [34] Dostupné na: <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html> [online 12.3.2009]
- [35] Dostupné na: <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html> [online 12.3.2009]
- [36] Dostupné na: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc [online 12.3.2009]
- [37] Dostupné na: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALB.htm [online 12.3.2009]
- [38] KLOUDA, P., Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, 132 s.
- [39] Dostupné na: http://cs.wikipedia.org/wiki/Pistove_cerpadlo [online 12.3.2009]
- [40] Dostupné na: <http://www.hplc.cz/> [12.3.2009]
- [41] ANYAKORA, Ch., AFOLAMI, I., EHIANETA, T., ONWUMERE, F. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 2(2), 2008, p. 29 – 36
- [42] MUNOZ, A., ORTIZ, R., MURCIA, M. A. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage, *Food Chemistry*, Vol. 49, 1994, p. 203 – 206
- [43] ROMERA, J. M., RAMIREZ, M., GIL, A. Determination of Pantothenic Acid in Infant Milk Formulas by High Performance Liquid Chromatography, *Journal Dairy Science*, Vol. 79, 1996, p. 523 – 526

- [44] ALBALÁ–HURTADO, S., VECIANA–NOGUÉS, M. T., IZQUIERDO–PULIDO, M., MARINÉ–FONT, A. Determination of water–soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 778, 1997, p. 247 – 253
- [45] NDAW, S., BERGAENTZLÉ, M., AOUDÉ–WERNER, D., HASSELMANN, C. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs, *Food Chemistry*, vol. 71, 2000, p. 129 – 138
- [46] ARELLA, F., LAHÉLY, S., BOURGUIGNON, J. B., HASSELMANN, C. Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study, *Food Chemistry*, Vol. 95, 1996, p. 81 – 86
- [47] BERGAENTZLÉ, M., ARELLA, F., BOURGUIGNON, J. B., HASSELMANN, C. Determination of vitamin B₆ in foods by HPLC – a collaborative study, *Food Chemistry*, Vol. 52, 1996, p. 81 – 86
- [48] GLISZCZYŃSKA–ŚWIGŁO, A., KOZIOŁOWA, A. Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food, *Journal of Chromatography A*, Vol. 881, 2000, p. 285 – 297
- [49] GLISZCZYŃSKA, A., KOZIOŁOWA, A. Chromatographic determination of flavin derivatives in baker`s yeast, *Journal of Chromatography A*, Vol. 822, 1998, p. 59 – 66
- [50] PAPASTOYIANNIDIS, G., POLYCHRONIADOU, A., MICHAELIDOU, A. M., ALICHANIDIS, E. Fermented Milks Fortified with B–Group Vitamins: Vitamin Stability and Effect on Produkt Characteristics, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UHT	Ultra High Temperature Ultra vysoká teplota
FAO	Food and Agriculture Organization Organizace pro výživu a zemědělství
WHO	World Health Organization Světová zdravotnická organizace
ČMK	Čistá mlékárenská kultura
TDP	Thiamindifosfát
TTP	Thiamintrifosfát
UV	Ultrafialové záření
FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavinadenindinukleotid
NAD ⁺ , NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ , NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
CoA	Koenzym A
ACP-SH	Acyl Carrier Protein
TH ₄	Tetrahydrofolát
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Vysoce účinná kapalinová chromatografie
RP HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Reverzní vysoce účinná kapalinová chromatografie
PEEK	Polyéteréterketon

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Spotřeba sýrů v ČR v letech 1996 – 2006 [16]	20
Obr. 2. Schéma kapalinového chromatografu	41
Obr. 3. Dávkovací ventil	42
Obr. 4. Ventil se smyčkou při plnění	43
Obr. 5. Ventil se smyčkou naplněný	43
Obr. 6. Schéma HPLC kolony	44
Obr. 7. Schéma detektoru s diodovým polem	45
Obr. 8. Schéma fluorescenčního detektoru	46
Obr. 9. Schéma elektrochemického detektoru	47
Obr. 10. Schéma vodivostního detektoru	48
Obr. 11. Chromatogram	49

SEZNAM TABULEK**Tab. 1. Obsah hlavních minerálních látek v mléce [7]14****Tab. 2. Průměrné obsahy vitamínů v mléce [7]15**

SEZNAM PŘÍLOH

P I. OBSAH VITAMÍNŮ SKUPINY B VE VYBRANÝCH DRUZÍCH SÝRA

PŘÍLOHA P I: OBSAH VITAMÍNŮ SKUPINY B VE VYBRANÝCH DRUZÍCH SÝRA [19]

Sýr	Thiamin (mg)	Riboflavin (mg)	Kyselina nikotinová a nikotinamid (mg)	Pyridoxin (mg)	Kyselina pantotenová (mg)	Kyselina listová (μg)	Kyanokobalamin (μg)
Brie	0,070	0,520	0,380	0,235	0,690	65,0	1,650
Camembert	0,028	0,488	0,630	0,227	1,364	62,2	1,296
Cheddar	0,027	0,375	0,080	0,074	0,413	18,2	0,827
Cottage, 1 % tuku	0,021	0,165	0,128	0,068	0,215	12,4	0,633
Edam	0,037	0,389	0,082	0,076	0,281	16,2	1,535
Feta	0,154	0,844	0,991	0,424	0,967	32,0	1,690
Gouda	0,030	0,334	0,063	0,08	0,34	20,9	1,535
Parmesan	0,045	0,386	0,315	0,105	0,527	8,0	1,400
Provolone	0,019	0,321	0,156	0,073	0,476	10,4	1,463